

**Vergleichende Analyse der Reparatur von strahleninduzierten  
DNA-Schäden und der strahleninduzierten Apoptose in  
Lymphozyten junger Lungentumorpatienten und gesunder  
Kontrollpersonen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Vorgelegt von  
Irene Jaehnert  
29. Juli 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2008

# I

3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	35
3.2.1.1	Kultur von Säugerzelllinien.....	35
3.2.1.2	Gefrierkultur von Säugerzellen.....	35
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	36
3.2.1.4	Gewinnung und Gefrierkultur von primären Lymphozyten.....	36
3.2.1.5	Immortalisierung der primären Blutzellen durch das Epstein-Barr-Virus.....	36
3.2.1.6	Behandlung der Zellen mit verschiedenen Noxen.....	37
3.2.1.6.1	Behandlung mit Methylmethansulfonat.....	37
3.2.1.6.2	Bestrahlung mit einer $\gamma$ -Quelle.....	37
3.2.2	RNA Interferenz (RNAi): post-transkriptioneller <i>knockdown</i> spezifischer Gene durch chemisch synthetisierte siRNA.....	37
3.2.2.1	Herunterregulierung der Aktivität von <i>XRCC1</i> .....	39
3.2.2.2	Auswahl der geeigneten siRNA-Sequenzen.....	39
3.2.2.3	Hybridisierung chemisch synthetisierter siRNAs.....	40
3.2.2.4	Transfektion von adhärenz Säugerzellen (mit chemisch synthetisierten siRNAs).....	40
3.2.3	Arbeiten mit DNA.....	41
3.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
3.2.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	42
3.2.4	Alkalischer <i>Comet Assay</i> .....	42
3.2.5	Arbeiten mit RNA und cDNA.....	45
3.2.5.1	RNA-Isolation mit RNeasy.....	45
3.2.5.2	cDNA-Synthese mittels RT-PCR.....	45
3.2.5.3	Quantitative <i>real-time-PCR</i> im <i>LightCycler</i> .....	46
3.2.6	Proteinchemische Methoden.....	48
3.2.6.1	Proteinisolation aus Säugerzellen.....	48
3.2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	48
3.2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	48
3.2.6.4	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose....	50
3.2.6.5	Immundetektion von Proteinen.....	50
3.2.6.6	Entfernen von Antikörpern.....	51
3.2.7	Kolorimetrische Bestimmung zur Quantifizierung des $\text{NAD}^+$ -Gehalts.....	51
3.2.8	Durchflusszytometrische Methoden.....	53
3.2.8.1	Annexin V-Assay zur Quantifizierung der induzierten Apoptose in Lymphozyten.....	53
3.2.8.2	Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1).....	54
3.2.8.3	Detektion von Caspasen durch einen fluorchrommarkierten Caspaseinhibitor.....	55
3.2.9	Vergleichende Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur in Zellextrakten.....	57
3.2.9.1	<i>Annealing</i> der DNA-Oligonukleotide.....	58
3.2.9.2	Vorbereitung der Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA... 58	58
3.2.9.3	Markierung der Standardoligonukleotide für die Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur.....	59
3.2.9.4	Herstellung von Zellextrakten.....	59
3.2.9.5	Nachweis von Produkten der Basenexzisionsreparatur.....	59

4	Ergebnisse.....	61
4.1	Untersuchungen zur DNA-Reparatur .....	61
4.1.1	Vergleich von primären Lymphozyten eines Patienten- und eines Kontroll-Kollektivs im alkalischen <i>Comet Assay</i> .....	61
4.1.1.1	Ermittlung von Korrelationen zwischen Auswertungsgruppen und ermittelten Werten im <i>Comet Assay</i> .....	62
4.1.1.2	Ermittlung von Korrelationen zwischen Auswertungsgruppen und ermittelten Werten im <i>Comet Assay</i> unter Verwendung des TOM .....	62
4.1.1.3	Ermittlung von Korrelationen zwischen Auswertungsgruppen und ermittelten Werten im <i>Comet Assay</i> unter Verwendung des DNA- Gehalts im Schweif.....	65
4.1.1.4	Statistische Auswertung des <i>Comet Assay</i> .....	68
4.1.2	Untersuchungen zu <i>XRCC1</i> .....	72
4.1.2.1	Vergleichende Untersuchungen an Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus <i>XRCC1</i> Arg280His aufweisen .....	72
4.1.2.2	Quantifizierung von <i>Xrcc1</i> in Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus <i>XRCC1</i> Arg280His aufweisen .....	72
4.1.2.3	Quantifizierung des NAD <sup>+</sup> -Gehalts.....	74
4.1.2.3.1	Quantifizierung des NAD <sup>+</sup> -Gehalts in Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus <i>XRCC1</i> Arg280His aufweisen nach Behandlung mit verschiedenen Noxen .....	74
4.1.2.4	Vergleichende Quantifizierung von Produkten der Basenexzisions- reparatur.....	77
4.1.2.4.1	Überprüfen der Qualität der Positivkontrolle für die Quanti- fizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur .....	77
4.1.2.4.2	Vergleichende Quantifizierung von Produkten der Basenexzisions- reparatur in der Positivkontrolle.....	78
4.1.2.4.3	Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur für verschiedene Zelllinien.....	80
4.2	Untersuchungen zur Apoptose .....	82
4.2.1	Analysen von primären Lymphozyten eines Patienten- und eines Kontroll-Kollektivs mittels Annexin V- <i>Assay</i> .....	82
4.2.1.1	Statistische Auswertung zum Annexin V- <i>Assay</i> zur Quantifizierung der induzierten Apoptose in Lymphozyten .....	83
4.2.1.2	Vergleich von frisch isolierten Lymphozyten und kryokonservierten Lymphozyten im Annexin V- <i>Assay</i> .....	88
4.2.1.3	Auswahl der im Annexin V- <i>Assay</i> getesteten Proben für eine EBV- vermittelte Immortalisierung.....	89
4.2.1.4	Analyse der Verteilung von B- und T-Lymphozyten im Annexin V- <i>Assay</i> .....	90
4.2.2	Analyse des Apoptoseverhaltens in lymphoblastoiden Zelllinien.....	92
4.2.2.1	Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1) in lymphoblastoiden Zelllinien.....	92
4.2.2.2	Detektion von Caspasen durch einen Caspaseinhibitor in lymphoblastoiden Zelllinien.....	94
4.2.2.3	Vergleichende Analyse der Apoptoseraten in primären Lymphozyten und korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien .....	95

5	Diskussion .....	98
5.1	Analysen zur DNA-Einzelstrangbruchreparatur .....	100
5.1.1	Alkalischer <i>Comet Assay</i> .....	100
5.1.1.1	Alkalischer <i>Comet Assay</i> : Betrachtung der Basalschäden .....	100
5.1.1.2	Alkalischer <i>Comet Assay</i> : Betrachtung der strahleninduzierten Schäden.....	102
5.1.1.3	Alkalischer <i>Comet Assay</i> : Betrachtung der DNA-Reparaturkapazität..	102
5.1.2	Untersuchungen des Basenexzisionsreparatur-Gens <i>XRCC1</i> .....	104
5.1.2.1	Quantifizierung des NAD <sup>+</sup> -Gehalts .....	106
5.1.2.2	Quantifizierung des NAD <sup>+</sup> -Gehalts nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung.....	107
5.1.2.3	Quantifizierung des NAD <sup>+</sup> -Gehalts nach Behandlung mit MMS .....	108
5.1.2.4	Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur .....	110
5.2	Nachweis der Apoptose nach ionisierender Bestrahlung .....	112
5.2.1	Annexin V-Assay in primären Lymphozyten .....	114
5.2.1.1	Auswahl der Proben für eine EBV-vermittelte Immortalisierung.....	116
5.2.2	Vergleich des Apoptoseverhaltens in lymphoblastoiden Zelllinien und primären Lymphozyten .....	117
5.3	Schlussfolgerung und Perspektiven.....	119
6	Zusammenfassung .....	122
7	Literaturverzeichnis .....	124
8	Anhang .....	A

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Basenexzisionsreparatur. ....	8
Abbildung 2: Domänen der Protein-Protein-Interaktion im Xrcc1-Protein. ....	10
Abbildung 3: Schematische Übersicht der Wege zur Initiierung der Apoptose. ....	13
Abbildung 4: Schematische Übersicht über den intrinsischen oder mitochondrial vermittelten Weg zur Initiierung der Apoptose. ....	17
Abbildung 5: Schematische Übersicht über den extrinsischen oder todesrezeptorvermittelten Weg zur Initiierung der Apoptose. ....	18
Abbildung 6: Aufbau der Studie. ....	24
Abbildung 7: Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) durch chemisch synthetisierte siRNAs. ....	38
Abbildung 8: Lokalisierung der ausgewählten siRNAs im <i>XRCC1</i> -Gen. ....	39
Abbildung 9: Grundschemata für eine PCR. ....	41
Abbildung 10: Definition der Maße im <i>Comet Assay</i> . ....	44
Abbildung 11: Grundschemata für eine <i>real-time-PCR</i> . ....	47
Abbildung 12: <i>Enzyme cycling assay</i> zur Quantifizierung des $\text{NAD}^+$ -Gehalts. ....	52
Abbildung 13: Markierung der Zellen im Annexin V- <i>Assay</i> . ....	54
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Caspaseinhibitors FITC-VAD-FMK. ....	56
Abbildung 15: Funktionsweise der vergleichenden Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur in Zellextrakten. ....	57
Abbildung 16: <i>Boxplots</i> für die Medianverteilung des TOM in den einzelnen Auswertungsgruppen der Proben des KORA-Kollektivs sowie der LUCY-Kohorte. 63	
Abbildung 17: Darstellung der einer Gruppennormalisierung unterzogenen Medianwerte des TOM der einzelnen Gruppen für die unbestrahlten Proben zum Zeitpunkt 0. ....	65
Abbildung 18: <i>Boxplots</i> für die Medianverteilung des relativen DNA-Gehalts im Schweif in den einzelnen Auswertungsgruppen der Proben des KORA-Kollektivs sowie der LUCY-Kohorte. ....	66
Abbildung 19: Darstellung der einer Gruppennormalisierung unterzogenen Medianwerte des relativen DNA-Gehalts im Schweif der einzelnen Gruppen für die unbestrahlten Proben zum Zeitpunkt 0. ....	67
Abbildung 20: Werte der mit Hilfe des TOM im <i>Comet Assay</i> ermittelten $\text{DRC}_{\text{TOM}, t}$ der Proben des KORA-Kollektivs und der LUCY-Kohorte sowie der Standardkontrolle SM. ....	69
Abbildung 21: Werte der mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im <i>Comet Assay</i> ermittelten $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$ der Proben des KORA-Kollektivs und der LUCY-Kohorte sowie der Standardkontrolle SM. ....	71
Abbildung 22: Darstellung der Proteinbanden von Xrcc1 und Tubulin für Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus für <i>XRCC1</i> Arg280His. ....	73

Abbildung 23: NAD <sup>+</sup> -Gehalt von LUCY-Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus <i>XRCC1</i> Arg280His aufweisen vor und nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy.....	75
Abbildung 24: NAD <sup>+</sup> -Gehalt von Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus <i>XRCC1</i> Arg280His aufweisen vor und nach Behandlung mit 1 mM MMS.....	76
Abbildung 25: Relativer Gehalt an mRNA für das Zielgen zu einigen Zeitpunkten nach Transfektion.....	78
Abbildung 26: Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur im Polyacrylamidgel.....	79
Abbildung 27: Quantitative Auswertung der Reparaturprodukte des <i>short patch</i> -Weges der BER.....	81
Abbildung 28: <i>Dot Plot</i> der durchflusszytometrischen Analyse des Annexin V-Assays....	82
Abbildung 29: Stochastischer Graph für die Strahleninduktion von apoptotischen und nekrotischen Lymphozyten im Annexin V-Assay.....	84
Abbildung 30: Feststellen einer Korrelation der Werte für P <sub>apo, ind.</sub> in den Testgruppen mit den Werten der Standardkontrolle am Beispiel der Dosis von 0,8 Gy in der Auswertegruppe 2.....	86
Abbildung 31: Graphische Darstellung der Übergangswahrscheinlichkeiten P <sub>apo, ind.</sub> der induzierten Apoptose nach ionisierender Bestrahlung der Proben mit 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy als <i>Dot Blot</i> .....	87
Abbildung 32: Vergleich zwischen frisch isolierten und kryokonservierten Lymphozyten im Annexin V-Assay.....	88
Abbildung 33: Auswahl der Proben für eine EBV-vermittelte Immortalisierung.....	90
Abbildung 34: Prozentualer Anteil von B- und T-Lymphozyten an den Gesamtzellen im Annexin V-Assay.....	91
Abbildung 35: Prozentualer Anteil von B- und T-Lymphozyten an der apoptotischen und der nekrotischen Fraktion im Annexin V-Assay.....	92
Abbildung 36: Histogramme der Fluoreszenz von PI bei durchflusszytometrischen Messungen der Sub G1-Population.....	93
Abbildung 37: Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der Fluoreszenzintensität von Lymphozyten nach Behandlung mit dem fluoreszenzmarkierten Caspaseinhibitor FITC-VAD-FMK.....	94
Abbildung 38: Vergleich der induzierten Apoptose in primären Lymphozyten aus dem KORA-Kollektiv und ihren korrespondierenden Zelllinien.....	96
Abbildung 39: Schematische Übersicht über die Reaktionen auf ionisierende Strahlung in einer Zelle.....	99



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Agarosegelkonzentration und Auftrennungsvermögen. ....	42
Tabelle 2: Pipettierschema für den <i>Comet Assay</i> . ....	43
Tabelle 3: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Acrylamid / BisAA und Auftrennungsvermögen von SDS-Gelen. (nach Maniatis <i>et al.</i> ).....	49
Tabelle 4: Rezepturen für SDS-Polyacrylamid-Gele verschiedener Konzentration. ....	49
Tabelle 5: Quantitative Auswertung der Proteinbanden von Xrcc1 und Tubulin für Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus für den SNP <i>XRCC1</i> Arg280His. ....	4
Tabelle 6: Mit Hilfe des TOM im <i>Comet Assay</i> ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Kontrollzellen SM nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. ....	A
Tabelle 7: Mit Hilfe des TOM im <i>Comet Assay</i> ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Proben des KORA-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. ....	C
Tabelle 8: Mit Hilfe des TOM im <i>Comet Assay</i> ermittelte DNA-Reparaturkapazität in Proben des LUCY-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. ....	E
Tabelle 9: Mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im <i>Comet Assay</i> ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Kontrollzellen SM nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. ....	F
Tabelle 10: Mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im <i>Comet Assay</i> ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Proben des KORA-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. ....	H
Tabelle 11: Mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im <i>Comet Assay</i> ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Proben des LUCY-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. ....	J
Tabelle 12: $DRC_{TOM}$ und $DRC_{Tail\ DNA}$ -Werte von Proben, die als „Ausreißer“ klassifiziert wurden. ....	K
Tabelle 13: Übergangswahrscheinlichkeiten $P_{apo, ind.}$ der Kontrollzellen SM nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy in allen Versuchen. ....	L
Tabelle 14: Übergangswahrscheinlichkeiten $P_{apo, ind.}$ der KORA-Proben nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy. ....	M
Tabelle 15: Übergangswahrscheinlichkeiten $P_{apo, ind.}$ der LUCY-Patientenproben nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy. ....	N
Tabelle 16: Liste der erzeugten Zelllinien des KORA- und LUCY-Kollektivs. ....	O
Tabelle 17: Vergleich der strahleninduzierten Apoptoseraten in primären Lymphozyten mit ihren korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien in Proben des KORA-Kollektivs. ....	P
Tabelle 18: Vergleich der strahleninduzierten Apoptoseraten in primären Lymphozyten mit ihren korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien in Proben des LUCY-Kollektivs. ....	Q

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	DISC	<i>death-inducing signal complex</i>
ADH	Alkoholdehydrogenase	DMSO	Dimethylsulfoxid
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
Ak	Antikörper	DNase	Desoxyribonuklease
AP	alkalische Phosphatase	dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'- Triphosphat
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>	DRC	<i>DNA repair capacity</i>
APS	Ammoniumpersulfat	ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
AP-Site	<i>Apurinic / apyrimidinic site</i>	DSB	Doppelstrangbruch ( <i>double strand break</i> )
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>	DTT	Dithiothexitol
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated protein kinase</i>	dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'- Triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	EBV	Epstein-Barr-Virus
BER	Basenexzisionsreparatur	ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
BfS	Bundesamt für Strahlenschutz	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BH1 - BH4	<i>Bcl-2 homology domains</i>	FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Scanner / Sorter</i>
bideist.	zweifach destilliert	FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
BIR	<i>baculoviral IAP repeat</i>	FLICA	<i>fluorochrome labeled caspase inhibitor</i>
bp	Basenpaar(e)	FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
BRCT	<i>breast cancer proteins C Terminus-like</i>	FSC	<i>foward scatter, Vorwärtsstreulicht</i>
BS	<i>Bloom Syndrom</i>	fw	<i>forward</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )	G	Guanin
B2M	Beta-2-Mikroglobulin	x g	-fache Erdbeschleunigung
C	Cytosin	g	Gramm
°C	Grad Celsius	Gy	Gray
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>	h	Stunde ( <i>hour</i> )
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>	HCl	Salzsäure
Caspase	<i>cysteiny aspartatic acid- specific protease</i>	HKG	Haushaltsgen ( <i>house keeping gene</i> )
Cp	<i>Crossing point</i>	HR	Homologe Rekombinations- Reparatur
CPD	Cyclobutanpyrimidindimere	HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
CPK	Creatinphosphokinase	IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
CS	Cockayne Syndrom	ICAD	<i>inhibitor of caspase-activated DNase</i>
d	Tage ( <i>days</i> )	IFNR	Interferonrezeptor
Da	Dalton	IRIF	<i>Ionizing radiation-induced foci</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	k-	kilo-
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'- Triphosphat	KORA	<u>K</u> ooperative Gesundheitsforschung in der <u>R</u> egion <u>A</u> ugsburg
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'- Triphosphat		
DD	<i>death domain</i>		
ddTTP	3'-Deoxythymidin-5'- Triphosphat-Trilithiumsalz		
DED	<i>death effector domain</i>		
DEPC	Diethylpyrocarbonat		
dest.	destilliert		
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'- Triphosphat		

l	Liter	RPE-Zellen	<i>retinal pigment epithelial cell line</i>
$\lambda$	Wellenlänge ( <i>lambda</i> )		
LCL	EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie	rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
LM	<i>low melting</i>	RT	Raumtemperatur
LUCY	<i>Lung Cancer in the Young</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
M	Molar (mol / l)	SDSA	<i>synthesis dependent strand annealing</i>
m-	Milli- ( $10^{-3}$ )	sek	Sekunde
$\mu$ -	Mikro- ( $10^{-6}$ )	SFM	serumfreies Medium
min	Minute	siRNA	<i>small interference RNA</i>
MMR	Fehlpaarungsreparatur ( <i>mismatch-repair</i> )	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
MMS	Methylmethansulfonat	ss	<i>single stranded</i>
MTT	3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid	SSA	<i>single strand annealing</i>
MYH	<i>human DNA glycosylase MutY homolog</i>	SSB	<i>single strand break</i>
n-	Nano- ( $10^{-9}$ )	SSC	<i>side scatter, Seitwärtsstreulicht</i>
NaAc	Natriumacetat	T	Thymin
NaCl	Natriumchlorid	Tab.	Tabelle
NAD	Nicotinamadenindinukleotid	TAE-Puffer	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
NaOH	Natronlauge	TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
NBS	<i>Nijmegen Breakage</i> Syndrom	TBS-T	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	TCR	<i>transcription coupled repair</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>	$T_M$	Schmelztemperatur
NP-40	Nonidet® P 40 Substitute	TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
nt	Nukleotid	T4 PNK	T4 Polynukleotidkinase
NTD	N-terminale Domäne	TRAIL-R	<i>NF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
OD	optische Dichte	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
8-oxo-G	8-oxo-7,8-Dihydroguanin	Triton X-100®	Oktylphenylpoly-(ethylenglykolether) <sub>n</sub>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TTD	Trichothiodystrophie
PARP	Poly(ADP)ribose-Polymerase	Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	ÜN	über Nacht
PHA	Phytohämagglutinin	UTR	<i>untranslated region</i>
PI	Propidiumiodid	V	Volt
PMS	N-Methylphenazoniummethylsulfat	Vol	Volumen
Pol $\beta$	Polymerase $\beta$	v / v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
6-4-PP	6-4-Photoprodukt	w / v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
rev	<i>reverse</i>	XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing 1</i>
RNAi	RNA Interferenz		
RNase	Ribonuklease		
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies		

# 1 Problemstellung

## 1.1 Individuelle Strahlenempfindlichkeit

In klinischen Studien hat sich wiederholt gezeigt, dass Patienten, die sich einer Radiotherapie unterziehen müssen, unterschiedliche Strahlenreaktionen zeigen (Bentzen, 2006). Es treten Nebenwirkungen auf, die in vier Klassen unterteilt werden können. Als Grad 1 oder geringe Nebenwirkungen werden all diejenigen betrachtet, die spontan wieder abklingen, ohne Gegenmaßnahmen zu erfordern. Wird ambulante Behandlung mit leichter Medikation nötig, wird dies als mäßige Nebenwirkungen oder Grad 2 bezeichnet. Bei Bedarf an intensiveren medikamentösen und supportiven Maßnahmen bis hin zu stationärer Behandlung und nötigen Änderungen des Bestrahlungsprotokolls handelt es sich um Grad 3 oder starke Nebenwirkungen. Die vierte Gruppe, Grad 4 oder lebensbedrohliche Nebenwirkungen, umfasst alle Nebenreaktionen, die eine Unterbrechung der Therapie notwendig machen, da das Leben des Patienten bedroht ist (CTC; Seegenschmiedt *et al.*, 1999). Die Ursachen für diese Variabilität der Strahlensensitivität können genetischer oder epigenetischer Natur sein (Andreassen *et al.*, 2002). Während die meisten Patienten nur leichte Nebeneffekte zeigen, treten bei einem Anteil von 5 - 10% der Patienten schwere akute Strahlennebenwirkungen auf. Strahleneffekte beruhen auf Schäden der DNA (*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure), die in Geweben mit einer hohen Rate von Zellaustausch eine vorübergehende Suppression der Proliferation zur Folge haben (Rosen *et al.*, 2000). In den betroffenen Zellen können diese DNA-Schäden zu verschiedenen zellulären Antworten führen. Eine mögliche Strahlenreaktion besteht in der Reparatur der DNA-Schäden, die fehlerfrei oder fehlerhaft stattfinden kann. Fehlerfreie Reparatur führt zu normalem Fortbestehen der Zelle, fehlerhafte Reparatur kann toleriert werden, allerdings hat sie Veränderungen der DNA-Sequenz im Bereich des DNA-Schadens zur Folge. Eine weitere mögliche Strahlenreaktion besteht im Absterben der Zelle als programmierter Zelltod oder Apoptose, als Folge von Autophagie oder, bei zu großer Schädigung, auch unkontrolliert als Nekrose (Levine und Yuan, 2005; Bröker *et al.*, 2005).

Erhöhte Strahlensensibilität geht häufig mit einer erhöhten Disposition für Krebs einher. Die Ursache für erhöhte Strahlenempfindlichkeit liegt, ebenso wie die Ursache für Krebsentstehung, häufig in Änderungen von Faktoren, die dem Erhalt der genetischen Stabilität dienen. Dazu gehören unter anderem die Zellzyklusregulation, DNA-Reparaturvorgänge, metabolische Vorgänge und der Zelltod.

Es sind einige Syndrome bekannt, die beim Menschen zu erhöhter Strahlensensitivität führen. Dazu gehören unter anderem die seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Syndrome *Ataxia telangiectasia* (AT) (Taylor *et al.*, 2004), *Nijmegen Breakage* Syndrom (NBS) (Varon *et al.*, 1998; Tauchi, 2000) und *Bloom* Syndrom (BS) (Guo *et al.*, 2007). Bei diesen Syndromen sind die Gene *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated protein kinase*), *NBS1* oder *BLM* betroffen. Die entsprechenden Genprodukte sind direkt oder indirekt an der Reparatur der nach Bestrahlung geschädigten DNA beteiligt oder vermitteln die zelluläre Antwort auf diese Schäden (Jang *et al.*, 2004). Zellen von Patienten, die an einem dieser Syndrome leiden, zeigen erhöhte genomische Instabilität und die Patienten entwickeln überdurchschnittlich oft schon im jungen Alter maligne Erkrankungen (Wright, 1999; Taylor, 2001). Auch heterozygote Träger von Mutationen dieser Gene zeigen bereits ein erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken (Nowak *et al.*, 2008; Seemanová *et al.*, 2007).

Neben diesen bekannten genetischen Ursachen für eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit gibt es Patienten, deren Strahlenempfindlichkeit nicht durch eine Mutation in diesen Genen erklärt werden kann. Die Ursache für ihre erhöhte Strahlenempfindlichkeit ist also zunächst völlig unbekannt und die Patienten verhalten sich klinisch meist unauffällig. Erst im Laufe einer Strahlentherapie reagieren diese Personen mit erheblichen Nebenwirkungen auf die ionisierende Bestrahlung. Es ist anzunehmen, dass bei ihnen noch unbekannte Faktoren betroffen sind, die die Strahlenantwort modulieren. Dies könnten z. B. Faktoren sein, die an weiteren DNA-Reparaturmechanismen wie beispielsweise der Basenexzisionsreparatur, der Nukleotidexzisionsreparatur oder der Mismatch-Reparatur, aber auch anderen Wegen der DSB-Reparatur beteiligt sind. Auch die Aktivierung von Signalketten und so z. B. die Regulation der Apoptose als mögliche Strahlenantwort können in diesen Patienten für die veränderte Strahlenempfindlichkeit verantwortlich sein. Die Variabilität in der Strahlenantwort innerhalb eines Kollektivs lässt sich zum einen *in vivo* an den akuten und späten Strahlenreaktionen von Personen, die sich einer therapeutischen Bestrahlung unterziehen, untersuchen, zum anderen auch *in vitro* an der Strahlenantwort von isolierten Lymphozyten geeigneter Spender. So konnte beispielsweise

in einem Vergleich zwischen einem Kollektiv von Brustkrebspatientinnen und einem Kontroll-Kollektiv im alkalischen *Comet Assay* nach ionisierender Bestrahlung festgestellt werden, dass in isolierten Lymphozyten der Mammakarzinompatientinnen bereits der Hintergrundschaden in unbestrahlten Proben, aber auch der Initialschaden unmittelbar nach Bestrahlung deutlich höher lag als in Proben des gesunden Spender-Kollektivs (Shahidi *et al.*, 2007). Bereits früher konnte in einer anderen Studie (Scott *et al.*, 1999) festgestellt werden, dass in Brustkrebspatientinnen eine höhere Strahlenempfindlichkeit auftrat als in einer Kontrollgruppe.

## **1.2 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit sollten die DNA-Einzelstrangbruchreparatur nach Schadensinduktion durch ionisierender Bestrahlung sowie die Apoptoserate nach ionisierender Bestrahlung in den isolierten Lymphozyten eines Kollektivs junger Lungenkrebspatienten (LUCY, *lung cancer in the young*) (Rosenberger *et al.*, 2008) mit den Werten, die für ein gesundes Kontroll-Kollektiv (KORA, Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) (Löwel *et al.*, 2005) ermittelt werden, verglichen werden.

Das Ziel der vergleichenden Analysen der beiden Kollektive lag darin, festzustellen, ob in den Blutproben junger Lungenkrebspatienten eine von der Reaktion gesunder Kontrollpersonen abweichende Strahlenreaktion beobachtet werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass Lungenkrebs in der Regel erst in hohem Alter auftritt (Becker und Warendorf, 1998), wurde für junge Lungenkrebspatienten angenommen, dass eine genetische Prädisposition vorliegt. Daher war zu erwarten, dass Blutproben von Lungenkrebspatienten verminderte Reparatur oder Apoptose gegenüber Blutproben gesunder Kontrollpersonen zeigen.

Zusätzlich sollten lymphoblastoide Zelllinien (LCL), die aus Proben der beiden Kollektive erzeugt wurden, untersucht werden. Bezüglich der Apoptose sollte ein Vergleich zwischen den Apoptoseraten primärer Zellen und der LCL durchgeführt werden, um festzustellen, ob LCL in Analysen die nur limitiert verfügbaren primären Lymphozyten ersetzen können. Zur Analyse des Reparaturverhaltens in LCL wurden Zelllinien, die Träger eines Einzelnukleotidaustausches in einem Gen der Basenexzisionsreparatur (*XRCC1* Arg280His) sind, eingesetzt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Störungen der DNA-Reparatur beim Menschen

Beim Menschen sind bereits viele Genmutationen bekannt, die zu einem Krankheitsbild mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit führen. Zahlreiche dieser Gene codieren für DNA-Reparaturfaktoren, die die Reparatur von DNA-Schäden über die verschiedenen Reparaturmechanismen vermitteln. So gibt es z. B. Chromosomeninstabilitätssyndrome wie das *Nijmegen Breakage* Syndrom (NBS) (Varon *et al.*, 1998; Tauchi, 2000), *Ataxia telangiectasia* (AT) (Taylor *et al.*, 2004), und das *Bloom* Syndrom (BS) (Guo *et al.*, 2007), deren betroffene Genprodukte an der DNA-Doppelstrangbruch (DSB, *double strand break*) - Reparatur beteiligt sind. Patienten, die an *Xeroderma pigmentosum* (XP) (Kraemer *et al.*, 2007), Trichothiodystrophie (TTD) (Hoeijmakers, 2001) oder dem *Cockayne* Syndrom (CS) (Kraemer *et al.*, 2007) leiden, zeigen erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht aufgrund von Defekten in Genen der Nukleotidexzisionsreparatur (NER).

Die Mutationen in den jeweils betroffenen Genen der DNA-Reparatur dieser Syndrome führen dazu, dass induzierte Schäden in der DNA von Zellen der Patienten nicht effektiv und korrekt repariert werden können.

#### 2.1.1 Chromosomeninstabilitätssyndrome

Chromosomeninstabilitätssyndrome wie das *Nijmegen Breakage* Syndrom (Varon *et al.*, 1998; Tauchi, 2000) und *Ataxia telangiectasia* (Taylor *et al.*, 2004) beruhen auf Defekten in Genen, die an der DSB-Reparatur beteiligt sind. Der DNA-DSB ist nach Bestrahlung der seltenste, aber zugleich auch der schwerwiegendste DNA-Schaden. DSB können durch ionisierende Strahlung, Chemikalien oder freie Radikale induziert werden, treten aber auch z. B. bei der Replikation an DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB, *single strand break*) auf (Hoeijmakers, 2001). Die Reparatur von DSB kann mit Hilfe einer Vielzahl verschiedener Proteine durch homologieabhängige oder homologieunabhängige Prozesse erfolgen. Vorwiegend in der G1-Phase des Zellzyklus, in geringerem Maß aber auch in anderen Zellzyklusphasen, erfolgt in Säugerzellen die Reparatur eines DSBs über den homologieunabhängigen und damit fehleranfälligen Prozess der nichthomologen Endverknüpfung (*Non-homologous End-Joining*, NHEJ) (Collis *et al.*, 2005). Als homologieabhängige Reparatur werden das *single strand annealing* (SSA), das an Sequenzwiederholungen in der DNA eingesetzt werden kann, und die homologe

Rekombinations-Reparatur (HR) bezeichnet. Die HR, die auch als fehlerfreie Reparatur bezeichnet wird, erfolgt hauptsächlich in der S-Phase, wenn die DNA repliziert wird, und in der G2-Phase des Zellzyklus, da in diesen Zellzyklusphasen durch das Schwesterchromatid eine fehlerfreie Kopie der geschädigten Sequenz vorliegt (Helleday *et al.*, 2007).

Das Genprodukt des bei *Ataxia telangiectasia* betroffenen Gens *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated protein kinase*) spielt eine wichtige Rolle in der DSB-Reparatur (Taylor *et al.*, 2004). *ATM* phosphoryliert das Histon H2AX im Bereich des DSB innerhalb weniger Minuten nach ionisierender Bestrahlung, was zur Bildung von so genannten *ionizing radiation-induced foci* (IRIF) führt (Cann und Hicks, 2007). Auch Nbs1 als Teil des Rad50 / Mre11 / Nbs1 (MRN) - Komplexes (Cann und Hicks, 2007) wird durch *ATM* phosphoryliert. *NBS1* ist das betroffene Gen im *Nijmegen Breakage* Syndrom (Tauchi 2000), das Genprodukt wird als Nibrin bezeichnet (Seemanová *et al.*, 2007). Im MRN-Komplex ist es in der HR verantwortlich für die 5'→3' -Prozessierung der Bruchenden eines DNA-DSB (Hoeijmakers, 2001). Dies führt zur Entstehung von freien 3' -Überhängen. Durch verschiedene einzelstrangbindende Proteine, die diese Überhänge erkennen und binden, wird dann der Strangaustausch durch Invasion des einzelsträngigen Überhangs in die homologe Donorsequenz eingeleitet (Cann und Hicks, 2007). Die nun gepaarten DNA-Stränge bezeichnet man als Heteroduplex-DNA, der Strang der Donor-DNA dient hier als Matrize für eine DNA-Polymerase, die am 3' - OH - Ende den Beginn der DNA-Synthese einleitet. Die freien Enden werden nach erfolgreicher Synthese ligiert und die komplexe Struktur wird aufgelöst. Am häufigsten passiert dies durch die Synthese-abhängige Einzelstrang-Verknüpfung (*synthesis dependent strand annealing*, SDSA) (Shrivastav *et al.*, 2008), die zu fehlerfreier Reparatur des DSB ohne Austausch zwischen den beiden Schwesterchromatiden führt. Erfolgt die Invasion des Einzelstrangs in einen Donor-Doppelstrang für beide Bruchenden gleichzeitig, führt dies zu der komplexen Figur der Holliday-Strukturen. Um diese Strukturen aufzulösen, werden durch Endonukleasen Schnitte eingefügt und die entstehenden DNA-Enden neu verknüpft. Dieser Vorgang kann, je nachdem, wie die Schnitte gesetzt werden, zur Rekombination der Schwesterchromatiden führen (Helleday, 2003; Aylon und Kupiec, 2004; Krogh und Symington, 2004).

Im Gegensatz dazu werden bei dem NHEJ (Jeggo und Löbrich, 2006; Hefferin und Tomkinson, 2005; Collis *et al.*, 2005; Saleh-Gohari und Helleday, 2004; Helleday, 2003), das in Säugerzellen der wichtigste Weg der DSB-Reparatur ist (Collis *et al.*, 2005), die DNA-Enden zusammengeführt und direkt miteinander verknüpft. Das heterodimere Ku-Protein (Ku70 / Ku80) bindet zunächst die DNA-Bruchenden und rekrutiert die DNA-PK



(Proteinkinase) an den Bruchpunkt. In einem Komplex mit Artemis und dem MRN-Komplex erfolgt die Prozessierung der DNA-Enden, die gleichzeitig in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Abschließend werden die Enden durch den LigaseIV / Xrcc4-Komplex miteinander verknüpft. Dieser Reparaturvorgang verläuft häufig fehlerhaft, da keine homologe Sequenz als Matritze dient und somit auch Enden verknüpft werden können, die durch zwei unabhängige DSB entstanden sind. Eine mögliche Folge davon sind Chromosomenaberrationen wie Translokationen und dizentrische Chromosomen. Zudem können freiliegende DNA-Enden degradiert werden, was zu DNA-Deletionen führt (Burma *et al.*, 2006; Hefferin und Tomkinson, 2005).

### **2.1.2 Syndrome mit erhöhter UV-Empfindlichkeit**

Die seltenen, autosomal rezessiv vererbten genetischen Störungen *Xeroderma pigmentosum* (XP) (Kraemer *et al.*, 2007), Trichothiodystrophie (TTD) (Hoeijmakers, 2001) und das Cockayne Syndrom (CS) (Kraemer *et al.*, 2007) verursachen in Patienten, die an einem dieser Syndrome leiden, Überempfindlichkeit der Haut auf den UV-Anteil des Sonnenlichts und erhöhte Hautkrebsraten (Kleijer *et al.*, 2008). Die Ursache für diese Sensibilität liegt in allen drei Krankheiten in Mutationen in Genen, die eine Rolle in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) spielen. An der NER sind mindestens 25 verschiedene Proteine beteiligt, darunter Proteine der XP (*Xeroderma pigmentosum*)-Gruppe (Costa *et al.*, 2003), der CS (Cockayne Syndrom)-Gruppe und der TTD (Trichothiodystrophie)-Gruppe (Kraemer *et al.*, 2007). Basenschäden wie Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) und 6-4-Photoprodukte (6-4-PP), aber auch komplexere Basenschäden (*bulky lesion*), durch die die helikale Struktur der DNA verändert wird und Basenfehlpaarungen erzeugt werden, können durch die NER repariert werden (Hoeijmakers, 2001). Damit spielt die NER eine große Rolle bei der Reparatur von durch UV-Licht induzierten Schäden, ist jedoch nur nachrangig an der Reparatur von durch ionisierende Strahlung erzeugten Schäden beteiligt (Hoeijmakers, 2001; Kleijer *et al.*, 2008).

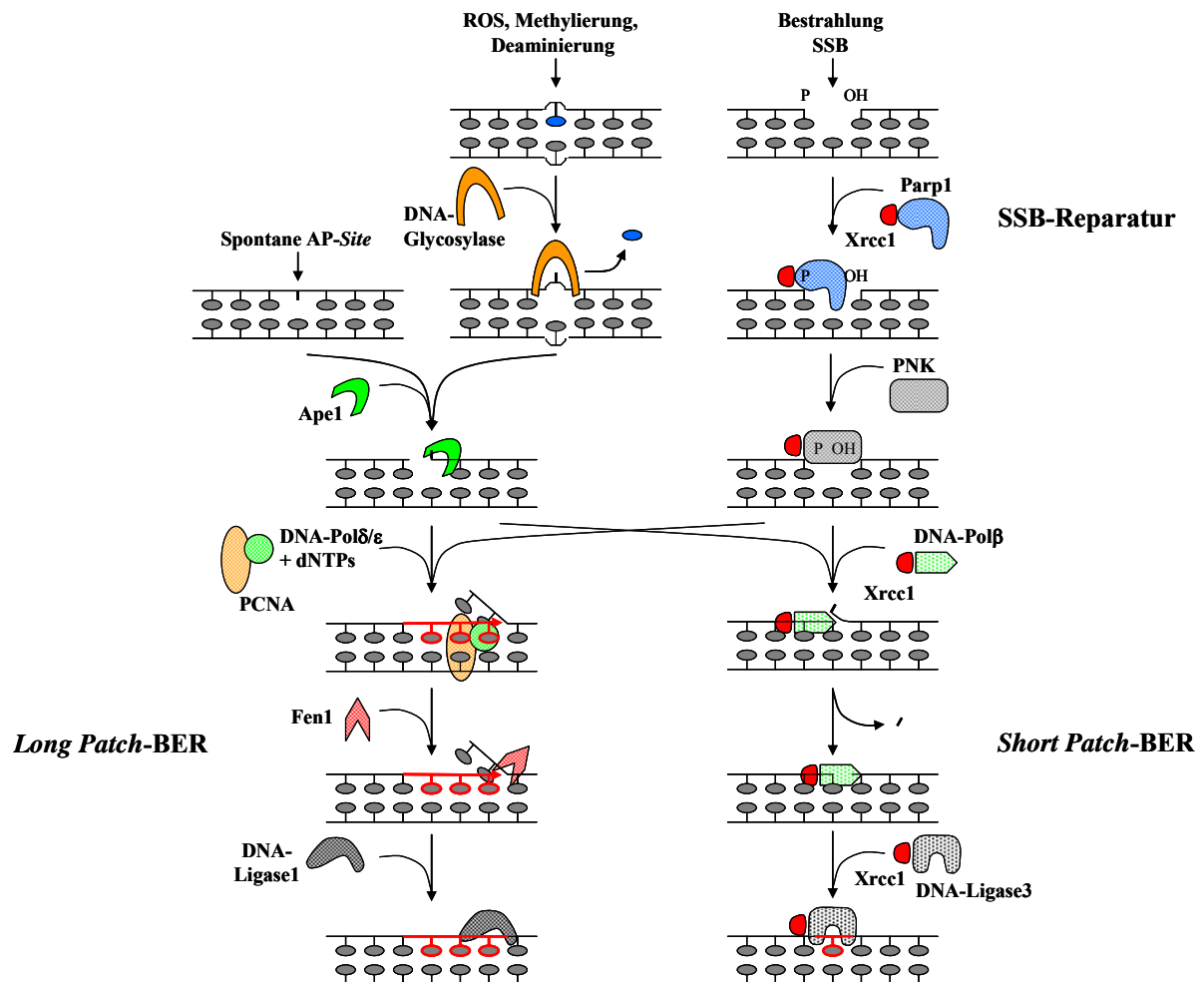
### **2.1.3 Basenexzisionsreparatur: ein DNA-Reparaturweg, für den keine assoziierten Syndrome bekannt sind**

Das Netzwerk der Exzisionsreparaturmechanismen ist ein unverzichtbarer und wichtiger Faktor, die genomische Stabilität zu erhalten, da die DNA während der DNA-Replikation, der Transkription, der genetischen Rekombination und durch reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS), die im normalen Zellstoffwechsel gebildet werden, ununterbrochen Basenschäden erleidet (Hoeijmakers, 2001). Mit Hilfe der Basenexzisionsreparatur (BER) können beispielsweise Schäden prozessiert werden, die unter anderem durch Strahlung oder ROS verursacht werden, darunter Basenläsionen wie 8-oxo-G (8-oxo-7,8-Dihydroguanin), aber auch depurinierte oder depyrimidierte Stellen, die so genannten AP-Sites (*apurinic / apyrimidinic sites*), die auch spontan entstehen können, sowie DNA-SSB (Frosina, 2007). In verschiedenen Untersuchungen zu Risiken der Krebsentstehung und Korrelationen zwischen Polymorphismen in Genen, die an der BER beteiligt sind, und Entstehung bestimmter Krebsformen, wurden widersprüchliche Ergebnisse gewonnen: einige Polymorphismen führen zu erhöhtem Risiko, einige haben keine Wirkung und andere scheinen sogar einen protektiven Effekt zu zeigen (Hung *et al.*, 2005).

Eine Besonderheit der BER gegenüber anderen DNA-Reparaturmechanismen liegt darin, dass bisher in Menschen keine vererbte Störung bekannt ist, der Mutationen in Genen dieses Reparaturweges zu Grunde liegen. Eine mögliche Begründung hierfür ist, dass die verschiedenen Wege der BER redundant funktionieren und so der Ausfall eines einzelnen Gens, wie beispielsweise für die Gene der Glykosylasen, keinen veränderten Phänotyp erzeugt. Veränderungen in mehreren Genen dagegen, z. B. im Prozess der Reparatur einer AP-Stelle, sind so schwerwiegend, dass sie letal wirken (Frosina, 2007).

In Analysen einiger Tumore kann allerdings festgestellt werden, dass in diesen Tumoren Mutationen in Genen der BER vorliegen. So kann beispielsweise in drei Geschwistern einer britischen Familie, in der das Colonkarzinom FAP (*familial adenomatous polyposis*) vorliegt, nicht die für FAP typische Mutation in dem Gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*) gefunden werden (Wilson III. und Bohr, 2007). Statt dieser häufigen Veränderung zeigen die Geschwister heterozygote Mutationen in dem humanen DNA-Glykosylase MutY-Homolog (*human DNA glycosylase MutY homolog*, MYH), einer Glykosylase, die vor allem in der BER von 8-oxo-G aktiv ist (Frosina, 2007).

Prinzipiell können zwei BER-Wege unterschieden werden: der *long patch*-Reparaturweg, der zum Austausch von bis zu zehn Nukleotiden führt, und der *short patch*-Reparaturweg, bei dem nur ein einzelnes Nukleotid ersetzt wird. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Reparaturwege der BER dargestellt.



**Abbildung 1: Mechanismus der Basenexzisionsreparatur.**

(Modifiziert nach Hoeijmakers, 2001). Es kann zwischen dem *long patch*-Reparaturweg und dem *short patch*-Reparaturweg unterschieden werden. Schäden, die durch BER repariert werden können, sind SSB, oxidierte, reduzierte oder fragmentierte Basen, die die Konformation der DNA unverändert lassen, und apurinische bzw. apyrimidinische Stellen der DNA (AP-Sites). Die genauere Erklärung des Reparaturvorgangs ist in Kapitel 2.1.3 zu lesen.

Beiden BER-Wegen ist gemeinsam, dass zunächst die geschädigte Base durch DNA-Glykosylasen erkannt und entfernt wird, gefolgt von einem Einschnitt in den Einzelstrang an der AP-Site. Die Entfernung des Zucker- und Phosphatrestes an der abasischen Stelle kann über verschiedene Mechanismen unter Beteiligung unter anderem von bifunktionalen Glykosylasen oder der Endonuklease Ape1 erfolgen. Durch verschiedene weitere Enzyme werden, sofern nötig, 3' - OH -Gruppen und 5' -Phosphatgruppen erzeugt. Die BER ist somit mit der Induktion von SSB an AP-Sites assoziiert.

Wird ein Schaden über den *long patch*-Reparaturweg prozessiert, bindet zunächst Pol $\beta$  (Polymerase  $\beta$ ) an den SSB und fügt das erste Nukleotid an (Fortini und Dogliotti, 2007). Sie wird danach durch einen PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)-Pol $\delta$ - / Pol $\epsilon$ -Komplex ersetzt, der die weitere Synthese eines Nukleotidabschnitts von insgesamt zwei bis 10 Basen durchführt. Die Endonuklease Fen1 schneidet und entfernt den nun überhängenden ursprünglichen Strang, so dass die Lücke durch Ligase1 geschlossen werden kann (Fortini und Dogliotti, 2007; Wilson III. und Bohr, 2007).

Wird dagegen der in Säugerzellen häufiger verwendete *short patch*-Reparaturweg bevorzugt, wird durch Pol $\beta$  ein Einzelnukleotid eingefügt und der Zuckerrest der abasischen Stelle entfernt. Der Xrcc1 (*X-ray repair cross complementing 1*)-Ligase3 Komplex kann im Anschluss die DNA ligieren (Fortini und Dogliotti, 2007).

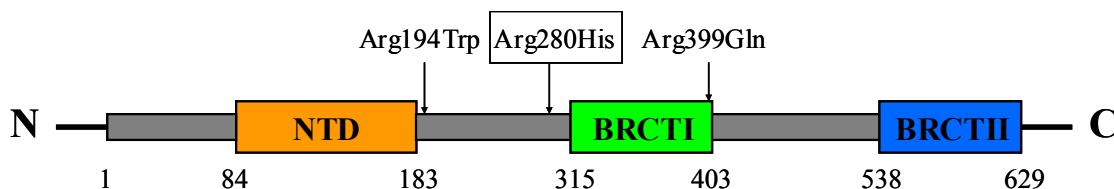
Die Reparatur von SSB wird durch Erkennung einer Schadensstelle durch die Poly(ADP)ribose-Polymerase (Parp), die in einem Komplex mit Xrcc1 vorliegt, initiiert. Durch aktives Parp1 erfolgt dann Poly(ADP)ribosylierung unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup>. Dies führt zur Rekrutierung weiterer an der DNA-Reparatur beteiligter Proteine an die Schadensstelle. Mit Hilfe verschiedener dieser Proteine werden unter anderem, sofern nötig, 5' - OH -Gruppen phosphoryliert und 3' -Enden dephosphoryliert (Wood *et al.*, 2005). Diese „sauberen“ Bruchenden mit 3' - OH - und 5' -Phosphatenden können nun, wie auch spontan entstandene „saubere“ Bruchenden, durch Ligasen verknüpft werden.

### **2.1.3.1 Ein wichtiger Faktor in der Basenexzisionsreparatur: *XRCC1* (*X-ray repair cross complementing 1*)**

Ionisierende Strahlung induziert in Zellen dicht gedrängte DNA-Schäden, darunter SSB und AP-Sites. Die Reparatur dieser Schäden kann mit Hilfe der BER erfolgen (Mourgues *et al.*, 2007). Das Protein Xrcc1, ein 70 kDa Protein, spielt aufgrund seiner multiplen Interaktionen mit anderen Proteinen, wie beispielsweise Parp1, DNA-Pol $\beta$  oder DNA-Ligase3, als „Gerüstprotein“ eine wichtige Rolle in der Koordination der BER und der SSB-Reparatur. Es stabilisiert andere Proteine und modifiziert ihre Aktivität, zeigt aber selber keine enzymatische Aktivität (Cornetta *et al.*, 2006; Brem und Hall, 2005). In Vergleichen bezüglich der BER in Hamsterzellen, die für *XRCC1* defizient sind (EM7), sowie in für *XRCC1* profizienten Hamsterzellen (AA8) konnte festgestellt werden, dass die Reparatur von AP-Stellen in Abwesenheit von Xrcc1 in reduziertem Maß stattfindet (Mourgues *et al.*, 2007).

Xrcc1 ist ein Protein von 629 kDa, das eine N-terminale Domäne (NTD) sowie zwei C-terminale Domänen (*Breast cancer proteins C Terminus-like*, BRCTI und BRCTII) besitzt, die an der Interaktion mit verschiedenen Proteinen beteiligt sind (Abbildung 2). Daher wird Xrcc1 auch als „*scaffold protein*“ oder „Gerüstprotein“ bezeichnet.

Die zentral liegende BRCTI-Domäne ermöglicht die Interaktion mit Parp1 und Parp2 und spielt eine wichtige Rolle bei deren Rekrutierung zu SSB. Sie ist wichtig für das Zellüberleben nach Behandlung mit MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, allerdings ist ihre Rolle in der Reparatur von durch MMS erzeugten SSB umstritten (Taylor *et al.*, 2002). Die Interaktion mit DNA-Ligase3α wird spezifisch durch die C-terminal gelegene BRCTII-Domäne ermöglicht. Deletionen oder Basenaustauschmutationen in dieser Domäne führen zu einer Verzögerung der Reparatur von durch alkylierende Agenzien induzierten SSB, auch wenn die DNA-Ligase3α in erhöhter Konzentration vorliegt (Moore *et al.*, 2000). Die NTD ist an der Interaktion mit DNA-Polβ beteiligt. Zusätzlich kann die zentrale Region von Xrcc1 mit dem Amino-Terminus von Ape1 interagieren, was zu einem fünffachen Anstieg der von Ape1 katalysierten Spaltung der DNA 5' der abasischen Stelle führt (Vidal *et al.*, 2001). Die Region zwischen den BRCT Domänen ist an der Bindung von PNK beteiligt.



**Abbildung 2: Domänen der Protein - Protein - Interaktion im Xrcc1-Protein.**

(Modifiziert nach Taylor *et al.*, 2002). In orange dargestellt ist die N-terminale Domäne (NTD), die an Interaktionen mit Polβ beteiligt ist. Die beiden Carboxyterminalen (BRCT) Domänen sind in der Zeichnung grün (BRCTI) und blau (BRCTII). Die zentral liegende BRCTI-Domäne ist verantwortlich für die Interaktion mit Parp1 und Parp2, die C-terminale Domäne BRCTII interagiert mit DNA-Ligase3α. Zusätzlich eingezeichnet ist die Lage von drei bekannten SNP (*single nucleotide polymorphism*) im Xrcc1-Protein. In dieser Arbeit findet nur der SNP *XRCC1* Arg280His Beachtung.

Die Regulierung der BER erfolgt neben Xrcc1 durch eine Vielzahl von Proteinen und weist auch eine zellzyklusabhängige Komponente auf. Durch Mutationen der BRCTII-Domäne, die für Interaktionen mit DNA Ligase3α verantwortlich ist, wird in der G1-Phase des Zellzyklus die Xrcc1 abhängige SSB-Reparatur verhindert (Caldecott *et al.*, 2001), in der S-Phase kann jedoch kein Effekt festgestellt werden (Taylor *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu ist die BRCTI-Domäne sowohl in der G1-Phase als auch in der G2- / S-Phase nötig für effiziente Reparatur von SSB (Taylor *et al.*, 2002). Dies legt den Schluss nahe, dass es verschiedene

SSB-Reparaturwege in verschiedenen Zellzyklusphasen gibt: eine schnelle Reparatur, die über die *short patch*-BER in der gesamten Interphase arbeitet sowie eine S- / G2-spezifische Reparatur, die den *long patch*-BER-Weg bevorzugt verwendet (Caldecott *et al.*, 2001).

Im Xrcc1-Protein sind drei SNP (*single nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotidpolymorphismus) bekannt, die zu Aminosäureaustauschen im Protein führen und daher möglicherweise funktionelle Auswirkungen haben (Ein großer Anteil der bisher bekannten SNP liegt in nichtcodierenden Bereichen und hat somit keine Auswirkungen auf die Funktion eines Proteins.). Es handelt sich hierbei um *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg280His und *XRCC1* Arg399Gln. In der vorliegenden Arbeit wird nur der SNP *XRCC1* Arg280His betrachtet (Abbildung 2).

## **2.2 Zelltod**

Neben DNA-Reparatur ist auch Zelltod eine wichtige Komponente zur Erhaltung der genetischen Stabilität (Kruman und Schwartz, 2008; Wistop *et al.*, 2005). Man kann zwischen verschiedenen Arten des Zelltods unterscheiden. Die Nekrose (Typ III) beispielsweise ist eine ungerichtete, passive Form des Zelltods, bei der eine frühe Zerstörung der Plasmamembran und der zellulären Strukturen zu einem unkontrollierten Ausstrom der Zellkomponenten in das umliegende Gewebe und dadurch zu Entzündungsreaktionen führt. In neueren Publikationen wird die These vertreten, dass auch Nekrose eine regulierte und programmierte Form des Zelltods ist (Bröker *et al.*, 2005). Der autophagische (Typ II) Zelltod basiert auf einem lysosomenvermittelten, katabolischen Programm, das Zellen durch Degradierung von entbehrlichen Proteinen und Organellen Überleben bei Mangel an Nährstoffen ermöglichen soll (Yu *et al.*, 2004; Levine und Yuan 2005). Autophagischer Zelltod zeichnet sich durch die Entstehung von Autophagosomen, durch die Zellen „sich selbst verdauen“, aus. Im Gegensatz zu Nekrose führt diese Art des Zelltods nicht zu entzündlichen Reaktionen im Gewebe (Levine und Yuan 2005). Der Begriff „Zelltod durch mitotisches Versagen“ bezeichnet einen Typ von Zelltod in Säugern, der durch fehlerhafte Mitose verursacht wird. Die mitotische Katastrophe ist durch die Entstehung von multinukleären, großen Zellen gekennzeichnet, die unkondensierte Chromosomen aufweisen. Diese können entstehen, wenn Defekte im G2-Kontrollpunkt auftreten, durch die Zellen, deren Replikation nicht abgeschlossen ist oder deren DNA-Schäden nicht repariert sind, in die Mitose eintreten können (Jin und El-Deiry, 2005). Zelltod, der durch zytoplasmatische Vakuolisierung als Folge von fortschreitendem Anschwellen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums (ER) gekennzeichnet

ist, wird als Paraptose bezeichnet. Paraptotische Zellen reagieren nicht auf Caspaseinhibitoren, da die Paraptose ohne Beteiligung der Caspasen abläuft und durch mitogen-aktivierte Proteinkinasen ausgelöst wird (Bröker *et al.*, 2005). Als Typ I oder programmierter Zelltod wird die Apoptose bezeichnet, die nicht nur als Antwort auf Schädigungen einer Zelle, sondern auch in der Entwicklung vieler Gewebe, der zellulären Homeostase, der Wundheilung und der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt. Eine Deregulation der Apoptose ist auch an verschiedenen Erkrankungen, so z. B. Krebs, AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*), der Alzheimerschen und der Parkinsonschen Krankheit (Farooqui *et al.*, 2007), sowie Alterungsprozessen beteiligt (Salvioli *et al.*, 2008). Zellen, die durch Strahlung, mutagene Substanzen oder virale Infektionen stark verändert oder geschädigt sind, können durch Apoptose aus dem Organismus entfernt werden. Erstmals definiert wurde die Apoptose durch Kerr und Wyllie (1972). Apoptotische Zellen durchlaufen bestimmte morphologische Veränderungen. Zunächst kondensiert das Chromatin, während sich die Kern- und Zellmembran zu wellen beginnen. Als Folge davon bilden sich Bläschen an der Zelloberfläche, die sich abschnüren und so Vesikel, die so genannten *apoptotic bodies*, bilden, die durch Phagozytose von Makrophagen entfernt werden können. Gleichzeitig erfolgt Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (Huerta *et al.*, 2007).

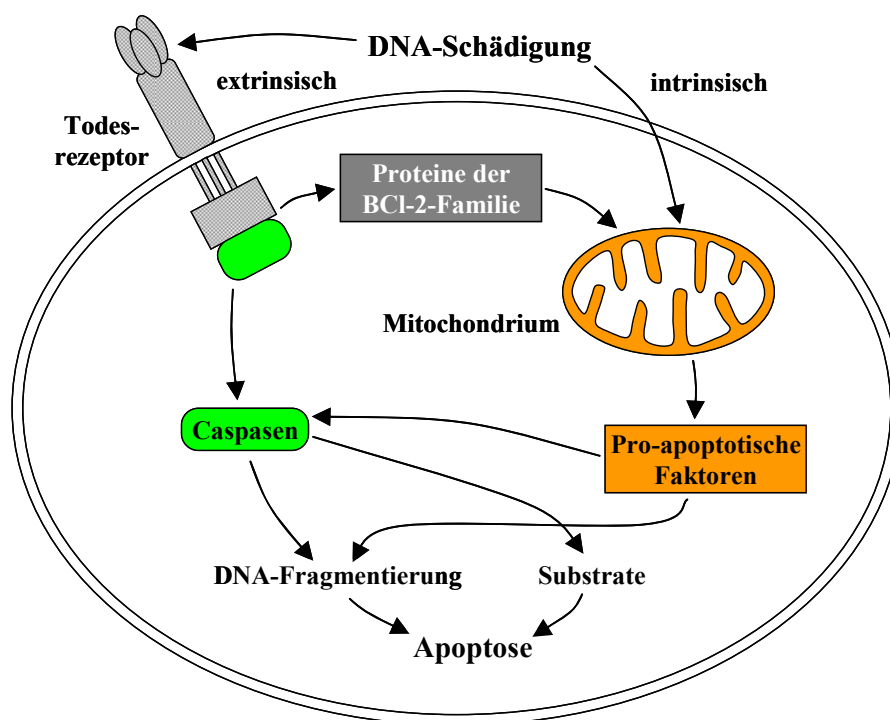
### **2.2.1 Apoptose**

Zellen, die durch  $\gamma$ -Strahlung geschädigt werden, haben verschiedene Möglichkeiten, auf die Schäden zu reagieren. Säugerzellen können beispielsweise in der Zellzyklusphase, in der sie sich zum Zeitpunkt der Schädigung befanden, verharren (Zellzyklusarrest), um den Schaden vor dem Übergang in die nächste Phase zu reparieren. Liegt eine zu große Schädigung vor, die nicht repariert werden kann, können die Zellen in Apoptose gehen. Die Entscheidung, in Zellzyklusarrest zu gehen, ist in Säugerzellen unter anderem abhängig von dem Tumorsuppressorgen *TP53*. Zellen, die einen Defekt in *TP53* aufweisen, können bereits vor beendeter DNA-Reparatur in die Mitosephase eintreten (Zhao *et al.*, 2001).

Tumorentstehung kann durch eine Verschiebung der Balance zwischen Überleben und Absterben einer veränderten Zelle in Richtung Überleben verursacht werden. In der Behandlung von Tumoren werden im Gegensatz dazu durch zytotoxische Therapien, wie  $\gamma$ -Bestrahlungstherapie und Chemotherapie, zelluläre Faktoren genutzt, die die Balance zugunsten eines evolutionär konservierten Apoptoseprogramms verschieben sollen (Fulda und Debatin, 2004). Häufig kann jedoch in Tumorzellen eine Abwehr und somit Resistenz des

Tumors gegen Bestrahlung festgestellt werden (Fulda und Debatin, 2004). Um Krebstherapien effizienter machen zu können und proapoptotische Faktoren zu unterstützen, ist ein Verständnis der Vorgänge während der Apoptose nötig.

Wie auch die DNA-Reparaturprozesse ist die Apoptose ein evolutionär stark konservierter Prozess, der über mehrere verschiedene Wege aktiviert werden kann. Die zwei Hauptwege, durch die die Apoptosekaskade initiiert werden kann, basieren zum einen auf dem Ausstrom von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien (mitochondrial vermittelter Weg), zum anderen auf Aktivierung der Todesrezeptoren (todesrezeptorvermittelter Weg) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Übersicht der Wege zur Initiierung der Apoptose.**

(Vereinfacht nach Ryter *et al.*, 2007; Fulda und Debatin, 2006; Debatin und Krammer, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005). Erfolgt Apoptose über den extrinsischen oder todesrezeptorvermittelten Weg, erfolgt zunächst die spezifische Bindung eines Liganden an den entsprechenden Todesrezeptor. Über eine Signalkette erfolgt die Aktivierung verschiedener Caspasen, die wiederum ihre Substrate aktivieren und zu DNA-Fragmentierung führen. Im mitochondrial vermittelten oder intrinsischen Apoptoseweg erfolgt die Aktivierung der Caspasen über eine Kaskade von pro-apoptotischen Faktoren. Über verschiedene Proteine der BCL-2 -Familie sind die beiden Apoptosewege miteinander verknüpft.

Im extrinsischen oder todesrezeptorvermittelten Apoptoseweg erfolgt die Induktion der Apoptose durch Bindung eines Liganden an seinen spezifischen Rezeptor. Durch diese Bindung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die über Aktivierung von Caspasen zu DNA-Fragmentierung und Spaltung verschiedener Substrate der Caspasen zu Apoptose führt. Die Caspasen sind eine spezielle Familie von Cysteinproteasen und werden spezifisch in Zellen



aktiviert, die Apoptose durchlaufen sollen (Degterev *et al.*, 2003). Die Regulation dieser Proteasen ist ein Hauptweg zur Kontrolle von apoptotischen Vorgängen. Die Aktivierung der Caspasen und der DNA-Fragmentierung erfolgt im intrinsischen oder mitochondrial vermittelten Apoptoseweg über Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien. Verschiedene Proteine der BCL-2 -Familie vermitteln eine Verknüpfung dieser beiden Apoptosewege (Ryder *et al.*, 2007).

### **2.2.1.1 Regulation der Apoptose**

#### **2.2.1.1.1 Caspasen**

Jeder Schritt der Apoptose wird durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert. Eine sehr wichtige Gruppe dieser Proteine ist die bereits erwähnte Familie der Caspasen (*cysteinyll aspartatic acid-specific protease*), die in Säugern mindestens 14 verschiedene Mitglieder umfasst. Diesen Caspasen ist gemeinsam, dass sie innerhalb der Zellen zunächst als inaktive latente Proenzyme vorliegen, die drei Domänen aufweisen: eine *death effector domain* (DED), eine *caspase recruitment domain* (CARD) und eine Prodomäne, die Todesdomäne (*death domain*, DD) genannt wird. Über Autoprozessierung oder proteolytische Spaltung durch aktive Caspasen an spezifischen Aspartatresten werden Caspasen aktiviert (Yan und Shi, 2005). Caspasen können in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe, die Caspase-1, -4 und -5 umfasst, ist an der proteolytischen Aktivierung von Zytokinen beteiligt und spielt eine zentrale Rolle in der Immunabwehr (Martinon und Tschopp, 2004). Die beiden weiteren Gruppen bezeichnen Caspasen, die für Apoptose benötigt werden. Es handelt sich um so genannte Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10), die wiederum die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) aktivieren können. Die Initiatorcaspasen zeichnen sich durch eine lange Prodomäne (> 90 Aminosäuren) aus, während Effektorcaspasen kurze Prodomänen (20 - 30 Aminosäuren) aufweisen. Caspase-8 und -10, die sich durch Ligand - Rezeptor Interaktionen autoaktivieren können, interagieren mit Hilfe einer DED direkt mit den Todesrezeptorkomplexen (Wang *et al.*, 2001), während Caspase-2 und -9 eine CARD-Domäne enthalten, die eine Interaktion mit den Effektorcaspasen ermöglichen. Effektorcaspasen können verschiedene Substrate spalten, deren Degradierung apoptotische Veränderungen hervorruft, darunter Proteine der Poly(ADP)ribose-Synthese (z. B. Parp1) und DNA-Topoisomerase I, die an Prozessen zur Erhaltung der DNA-Struktur, -Reparatur und -Replikation beteiligt ist. Weitere Substrate der Caspasen sind Faktoren, die die DNA-Degradierung steuern, wie der Inhibitor (*inhibitor of caspase-activated DNase*, ICAD)

der caspaseaktivierten DNase (*caspase-activated DNase*, CAD) und der *DNA fragmentation factor-45* (DFF45) (Liu *et al.*, 1999). Schließlich werden durch Caspasen auch Proteine wie Lamine degradiert, die für die Erhaltung der nukleären Strukturen entscheidend sind.

#### **2.2.1.1.2 Caspaseinhibitoren**

Da Caspasen Proteolyse katalysieren und die Proteolyse ein unumkehrbarer Prozess ist, unterliegt die Aktivierung und Aktivität von Caspasen in intakten Zellen strengen Kontrollen. Dies geschieht unter anderem mit Hilfe einer Familie zellulärer Proteine, die Inhibitorproteine der Apoptose (*inhibitor of apoptosis proteins*, IAP) genannt werden (Hunter, 2007). Sie besitzen eine Domäne von einer Länge von etwa 70 - 80 Aminosäuren, die als *baculoviral IAP repeat* (BIR) bezeichnet wird. In menschlichen Zellen liegen die IAP NAIP (*neuronal IAP*), c-IAP1 (*cellular IAP*), c-IAP2, XIAP (*X-chromosome-linked IAP*), Survivin, Livin und BRUCE (*BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme*) vor. Sie binden inaktive Caspase-3 und inhibieren die Aktivierung von Caspase-3, nicht aber von Caspase-8, und hemmen so die Auslösung des apoptotischen Phänotyps. Bei dem mitochondrial vermittelten Apoptoseweg wirken XIAP, c-IAP1 und c-IAP2, die an Procaspase-9 binden.

Die humanen zellulären Formen von FLIP (*FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) -like inhibitory protein*), genannt c-FLIP (*cellular FLIP*) (Yang, 2008), ein endogener Inhibitor von Caspase-8, trägt Sequenzhomologien zu Caspase-8 und inhibiert die rezeptorvermittelte Apoptose. Genau wie die Procaspase-8 besitzt FLIP zwei DEDs (*death effector domains*). Diese DEDs ermöglichen eine konkurrierende Bindung an die DEDs der an DISC (*death-inducing signaling complex*) beteiligten Proteine und inhibieren somit die Aktivierung von Caspase-8 (Vermeulen *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.1.3 Proteine der BCL-2 -Familie**

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die an der Regulation von Apoptose, insbesondere des mitochondrialen Wegs, beteiligt sind, ist die BCL-2 -Familie (Burlacu, 2003). Ihre Mitglieder können in proapoptotische Proteine wie Bax (*Bcl-2 associated X protein*), Bak, Bad, Bim etc., aber auch in antiapoptotische Proteine wie beispielsweise Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 unterteilt werden. Alle Mitglieder der Bcl-2 -Familie sind durch wenigstens eine der vier BH1 - BH4 (*Bcl-2 homology domains*) Domänen charakterisiert, die  $\alpha$ -helikalen Segmenten entsprechen. Im Gegensatz zu den proapoptotischen Proteinen zeigen die antiapoptotischen Proteine starke Konservierung in allen vier Domänen. Proapoptotische Proteine können unterteilt werden in

eine Unterfamilie, deren Mitglieder mehrere konservierte Domänen aufweisen, und eine Unterfamilie, deren Mitglieder (z. B. Bid, Bin und Bad) nur die BH3-Domäne aufweisen.

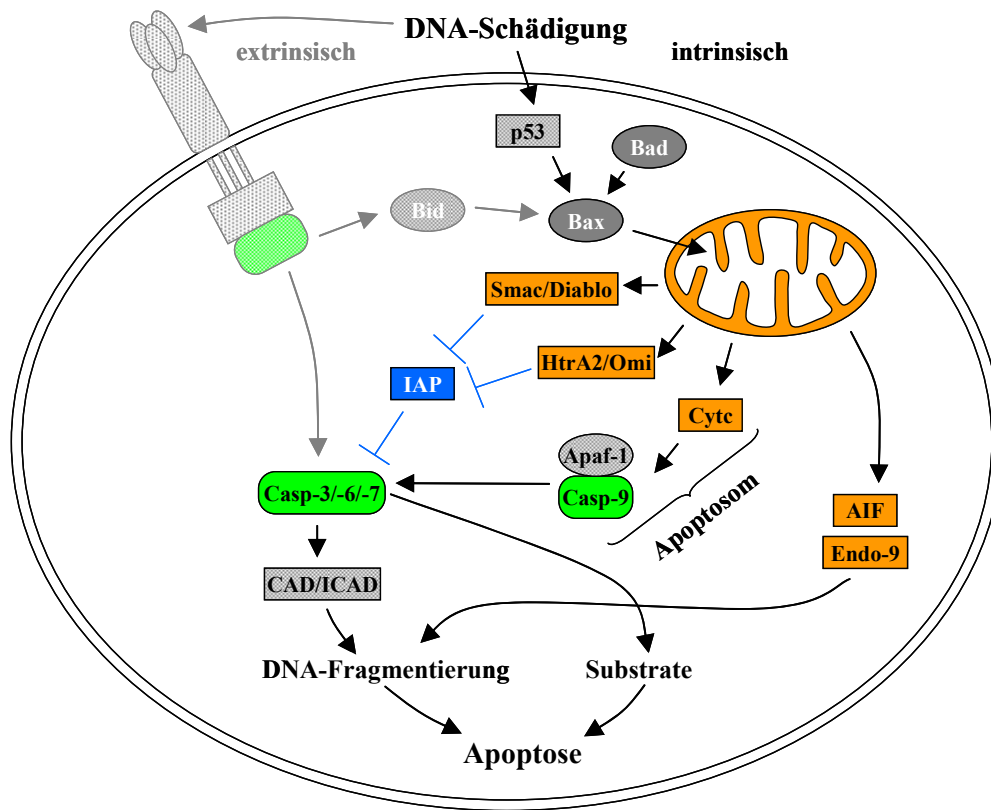
Die in Abwesenheit von Apoptosesignalen in bestimmten intrazellulären Kompartimenten lokalisierten Proteine der BCL-2 -Familie ändern ihre Lokalisierung und durchlaufen einige Modifikationen, wenn Apoptosesignale auftreten (Burlacu, 2003). Die zytosolischen proapoptotischen Proteine integrieren z. B. nach einer Konformationsänderung in die äußere Membran der Mitochondrien, wobei die antiapoptotischen Proteine, die in der Membran der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns lokalisiert sein können, neutralisiert werden. Antiapoptotische Proteine verhindern im Ruhezustand die Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum, während proapoptotische Proteine dieses erleichtern, sobald ein Apoptosesignal auftritt.

#### ***2.2.1.1.4 Mitochondrial vermittelter Apoptoseweg***

Der intrinsische oder mitochondrial vermittelte Apoptoseweg (Abbildung 4) wird induziert, wenn aufgrund eines DNA-Schadens p53 stabilisiert wird. Dies hat zur Folge, dass die Transkription des apoptoseinduzierenden Gens *BAX* hochreguliert und gleichzeitig die des antiapoptotischen Gens *BCL-2* herunterreguliert wird. Durch Permeabilisierung der äußeren Membran von Mitochondrien (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) (Erster und Moll, 2005) können Proteine, die zwischen den beiden Membranen liegen, wie z. B. Cytochrom c (Cyt<sub>c</sub>), in das Zytoplasma entlassen werden. Cyt<sub>c</sub> bildet zusammen mit Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), Procaspase-9 und dATP ein so genanntes Apoptosom, das zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Diese Initiatorcaspase kann ihrerseits die Effektorcaspasen-Kaskade (Caspase-3, -6 und -7) in Gang setzen. Die aktiven Caspasen-3, -6 und -7 spalten dann ihre Substrate. Diese Proteolyse führt schließlich zu Degradierung der DNA über den Verdau von ICAD.

Neben dieser Schlüsselreaktion des Cyt<sub>c</sub>-Ausstroms aus den Mitochondrien werden auch weitere Proteine in das Zytoplasma freigesetzt, unter ihnen AIF (*apoptosis inducing factor*), Smac / Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspase / direct inhibitor of IAP-binding protein with low pI*), HtrA2 / Omi und Endonuklease-9 (Endo-9). Smac / Diablo und HtrA2 / Omi fungieren als indirekte Caspaseaktivatoren, indem sie zytoplasmatische IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) binden und inhibieren (Saelens *et al.*, 2004). AIF und Endo-9 interagieren nicht mit IAP, sondern wandern in den Nukleus und beteiligen sich an der

Chromatinkondensation und der Degradierung der DNA (Ryter *et al.*, 2007; Fulda und Debatin, 2006; Debatin und Krammer, 2004).

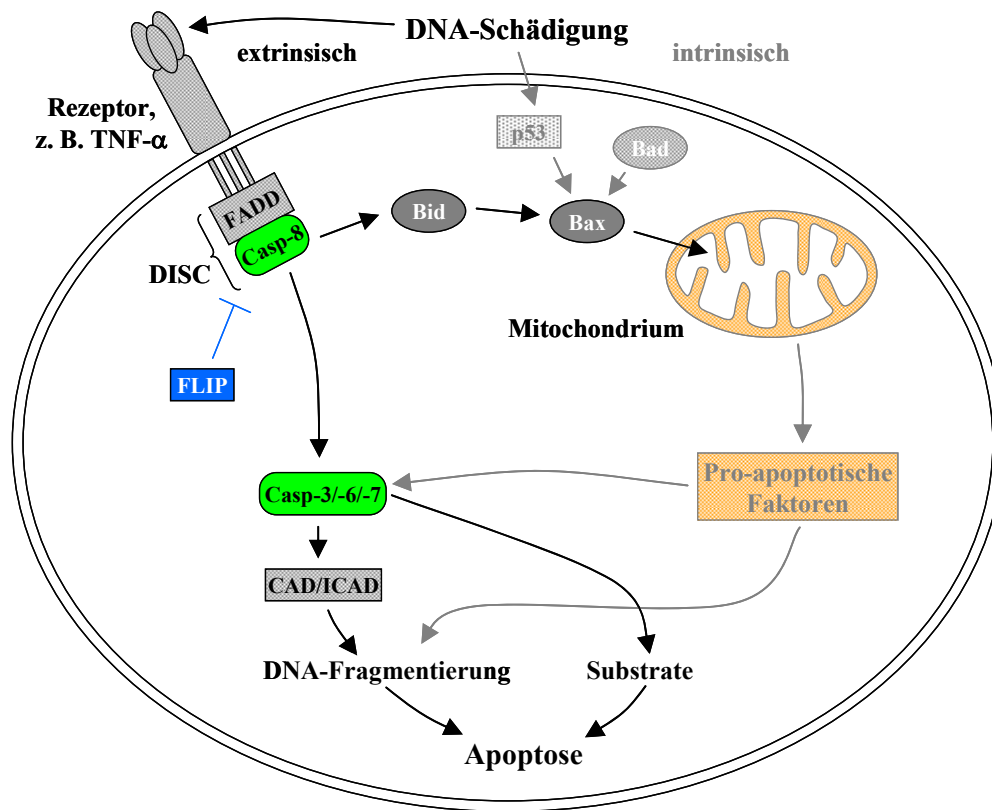


**Abbildung 4: Schematische Übersicht über den intrinsischen oder mitochondrial vermittelten Weg zur Initiierung der Apoptose.**

(Vereinfacht nach Ryter *et al.*, 2007; Fulda und Debatin, 2006; Debatin und Krammer, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005). Aufgrund eines DNA-Schadens erfolgt die Stabilisierung von p53, wodurch eine Heraufregulierung von Bax induziert wird. Durch die Integration in die Mitochondrienmembran können pro-apoptotischen Proteine der BCL-2 -Familie wie Bax in dieser Membran eine Art Poren bilden, die einen Ausstrom pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien bewirken. Die pro-apoptotischen Komplexe Smac / Diablo und HtrA2 / Omi wirken als indirekte Caspaseaktivatoren, da sie zytoplasmatische IAP inhibieren, wohingegen Cytc zusammen mit Apaf-1, Procaspase-9 und dATP ein so genanntes Apoptosom bildet, das direkt zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 führt. Durch Hemmung der IAP und Aktivierung der Caspase-9 wird die Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 ermöglicht. Die Effektorcaspasen spalten spezifisch ihre Substrate, darunter ICAD und CAD, was unter anderem zur Fragmentierung der DNA und so zum apoptotischen Phänotyp führt. AIF und Endo-9, weitere aus den Mitochondrien freigesetzte pro-apoptotische Faktoren, wandern direkt in den Nukleus und beteiligen sich hier an der Chromatinkondensation und der DNA-Fragmentierung. Der extrinsische Weg der Apoptose ist in helleren Farben angedeutet.

### 2.2.1.1.5 Todesrezeptorvermittelter Apoptoseweg

Erfolgt die Induktion der Apoptose durch Bindung eines Liganden an einen Todesrezeptor, wird der Apoptoseweg als todesrezeptorvermittelter oder extrinsischer Weg bezeichnet (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Übersicht über den extrinsischen oder todesrezeptorvermittelten Weg zur Initiierung der Apoptose.**

(Vereinfacht nach Ryter *et al.*, 2007; Fulda und Debatin, 2006; Debatin und Krammer, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005). Bei dem extrinsischen Weg der Apoptose wird durch eine DNA-Schädigung die spezifische Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor ausgelöst. Dies führt zu Oligomerisierung des Rezeptors. An die DD des oligomerisierten Rezeptors wird nun FADD rekrutiert. FADD interagiert mit Procaspase-8, die dadurch aktiviert wird. Dieser Komplex wird als DISC bezeichnet. Durch den Inhibitor FLIP kann die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert werden. Aktive Caspase-8 kann die Caspasen-3, -6 und -7 durch Spaltung aktivieren, die wiederum ihre Substrate, darunter CAD und den Inhibitor ICAD spalten können. Dies führt zu Fragmentierung der DNA und zu apoptotischem Phänotyp der Zellen. Der extrinsische Weg der Apoptose ist durch Aktivierung von Bid mit dem intrinsischen Weg verbunden. Der intrinsische Weg der Apoptose ist in helleren Farben angedeutet.

Bekannte Rezeptoren sind Fas (Apo-1 oder CD95), TNFR-1 (*tumor necrosis factor receptor-1*), IFNR (Interferonrezeptor) und TRAIL-R (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor* oder Apo-2). Diesen Rezeptoren der TNFR-Superfamilie ist gemeinsam, dass sie eine Todesdomäne (DD) am zytoplasmatischen Ende aufweisen. Bindet ein Ligand, z. B. Fas-Ligand, an seinen Rezeptor, in diesem Fall Fas, setzt dies die Oligomerisierung des Rezeptors in Gang, die wiederum zu Rekrutierung des Adapters FADD (*Fas-associated death domain protein*) an die DD des CD95-Rezeptors führt. Dies ermöglicht eine Interaktion der

Procaspase-8 mit FADD. Der so gebildete Komplex wird als DISC (*death-inducing signal complex*) bezeichnet und hat die Aktivierung der Caspase-8 zur Folge. Diese aktiviert wiederum Caspase-3 und andere Effektorcaspasen, wodurch die Apoptose initiiert wird. Der extrinsische Weg kann zusätzlich verstärkt werden, indem durch DISC Bid aktiviert wird und gefolgt davon Bax. Dies führt wie im intrinsischen Weg zur Ausschüttung von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranbereich der Mitochondrien. (Ryder *et al.*, 2007; Fulda und Debatin, 2006; Debatin und Krammer, 2004).

### **2.3 Proben-Kollektive**

In der vorliegenden Arbeit werden Versuche an primären Lymphozyten und daraus abgeleiteten Zelllinien verschiedener Spenderpersonen durchgeführt. Die primären Lymphozyten werden im Rahmen einer Kooperation von dem Institut für Epidemiologie im Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt. Sie stammen aus der LUCY (*Lung Cancer in the Young*)-Studie sowie dem Proben-Kollektiv der Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA). Zusätzlich werden in jedem Versuch Lymphozyten bzw. daraus abgeleitete lymphoblastoide Zellen einer internen Kontrollperson (SM bzw. SiMo) eingesetzt, um etwaige versuchsbedingte Schwankungen zu erfassen. Die Zelllinien werden durch das Institut für Epidemiologie im Helmholtz Zentrum München, soweit sie nicht bereits vorliegen, aus Lymphozyten von ausgewählten Proben nach einem Standardprotokoll (Neitzel, 1986) mit Hilfe der Marmoset-Lymphozytenlinie B95-8 hergestellt.

#### **2.3.1 Lung Cancer in the Young**

Die LUCY (*Lung Cancer in the Young*)-Studie ist eine Lungenkrebsstudie, in deren Rahmen seit 2000 Blut-, DNA- und Gewebeproben von Lungentumorpatienten aus 21 Kliniken in Deutschland und einer in Österreich, und zusätzlich, soweit möglich, deren Verwandten akquiriert werden. Bisher nehmen etwa 1900 Personen an dieser Studie teil, davon sind ca. 700 Patienten und 1200 Verwandten von einem Teil-Kollektiv von ungefähr 340 dieser Patienten. Zelllinien liegen bisher für etwa 650 der Proben vor. Ein Aufnahmekriterium der Studie ist das Alter der Patienten, das unter 50 Jahren liegen soll, da Lungenkrebs für gewöhnlich erst in hohem Alter auftritt (Becker und Warendorf, 1998). Daher wird bei Patienten, die in geringem Alter an Lungenkrebs erkranken, eine genetische Prädisposition vermutet. Zusätzlich spielen jedoch auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle, dies zeigt sich darin, dass die Mehrheit der Patienten Raucher sind oder waren (Rosenberger *et al.*, 2008). An den

gesammelten Proben wird für verschiedene Studien eine Genotypisierung mit Hilfe der MALDI TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry*) für Einzelnukleotidpolymorphismen in den Genen *SULT1A1* (Sulfotransferase 1A1), *XRCC1*, *hOGG1* (*human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1*), *ATM* und diversen anderen Gene durchgeführt (Rosenberger *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wird ausschließlich mit Lymphozyten und daraus abgeleiteten lymphoblastoiden Zelllinien der Patienten, nicht jedoch mit Proben der Familienmitglieder gearbeitet. Die Informationen bezüglich des Allelstatus des SNPs *XRCC1* Arg280His in einzelnen Proben wurden für die vorliegende Arbeit durch das Institut für Epidemiologie im Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt.

### **2.3.1.1 Einzelnukleotidpolymorphismen**

Als Einzelnukleotidpolymorphismen oder SNP (*single nucleotide polymorphism*) bezeichnet man Polymorphismen, die einzelne Nukleotide in der DNA betreffen und bei mindestens 1% der Mitglieder einer Population auftreten. Veränderungen dieser Art, die seltener auftreten, werden als Mutationen bezeichnet (Crawford und Nickerson, 2005). Die Mehrheit aller SNP besitzt zwei Allele, die einem einzelnen Basenaustausch entsprechen. Diese Allele werden nach der beobachteten Häufigkeit ihres Auftretens in einer Population als das häufige (*major*) und das seltene (*minor*) Allel bezeichnet. In einigen Fällen können auch mehr als zwei Allele für einzelne SNP gefunden werden (Schlötterer *et al.*, 2004). Einige der SNP sind so selten, dass sie in kleineren Untersuchungs-Kohorten nur in einem (singleton) oder zwei (doubletons) Individuen festgestellt werden können. Ein diploider Organismus kann homozygot Träger des häufigen oder des seltenen Allels sein oder aber heterozygot für diesen Locus sein. Die Vererbung von SNP erfolgt in der Regel stabil, das heißt nach den Mendelschen Regeln.

SNP treten häufig gekoppelt auf, so dass nicht festgestellt werden kann, welche dieser SNP für eine mögliche phänotypische Ausprägung verantwortlich ist und welcher nur einen Marker darstellt. Daher erscheint es sinnvoll, SNP nicht isoliert zu betrachten, sondern Kombinationen davon, den so genannten Haplotyp (Crawford und Nickerson, 2005).

In Datenbanken sind mittlerweile mehr als neun Millionen DNA-Sequenzvarianten erfasst, die SNP darunter machen vermutlich 90% der genetischen Variation aus. Zwei Drittel aller SNP beruhen auf einem Austausch von Cytosin mit Thymin. Ihre Verteilung im Genom ist nicht gleichmäßig, sie treten etwa im Abstand von 100 - 300 Basen auf (Crawford und Nickerson, 2005).

Der größte Teil der bisher bekannten SNP liegt außerhalb codierender Sequenzen. Ein geringer Teil der SNP, die innerhalb einer codierenden Sequenz liegen, kann einen Aminosäureaustausch und damit auch Veränderung der Proteinfunktion zur Folge haben. Daher kann es auch SNP geben, die homozygoten Trägern deutliche Nachteile bereiten, Krankheiten auslösen oder sogar letal sind (Crawford und Nickerson, 2005; Weiss, 1998).

Im Folgenden wird für SNP die Schreibweise „*XRCC1* Arg280His“ (exemplarisch für den am häufigsten genannten SNP) verwendet, wobei *XRCC1* für das betroffene Gen steht und 280 für die Aminosäure. Die Abkürzung vor der Positionsangabe (im Beispiel Arg) steht für das häufige Allel, diejenige danach für das seltene Allel (im Beispiel His). Wird von einem der beiden Allele gesprochen, so gilt die Schreibweise „das seltene Allel (*XRCC1* 280His)“ bzw. „das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg)“.

### **2.3.1.2 Einzelnukleotidpolymorphismen und Lungenkrebs**

Lungenkrebs hat weltweit einen großen Anteil an der Sterblichkeitsrate durch Krebserkrankungen (Rosenberger *et al.*, 2008; Schmezer *et al.*, 2001). Aus Statistiken zu Überlebensraten für kleinzellige (SCLC, *small cell lung cancer*) und nichtkleinzellige (NSCLC, *non-SCLC*) Lungenkarzinome kann ermittelt werden, dass fünf Jahre nach chemotherapeutischer Behandlung lediglich 15% aller Patienten am Leben sind (Jemal *et al.*, 2002). Allerdings variiert die Überlebensdauer in unterschiedlichen Patienten mit gleicher Krankheitssymptomatik erheblich (Matakidou *et al.*, 2007). Es ist daher von Interesse, prognostische Marker festzustellen, die Rückschlüsse auf das Überleben geben können. Ein Ansatz, solche Marker zu identifizieren, besteht in der Analyse von SNP insbesondere in Genen, die an DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind. Dies kann im Rahmen großer Fall - Kontroll-Studien geschehen, in denen die Häufigkeit im Auftreten einzelner SNP in einer Gruppe von Patienten den Häufigkeiten in einer vergleichbaren Kontrollgruppe gegenübergestellt werden. In einer Metaanalyse von Studien, die die BER-Gene *OGG1* (8-oxoguanine DNA glycosylase), *APE1* / *APEX1* (apurinic / apyrimidinic endonuclease), und *XRCC1* (*x-ray repair cross-complementing group 1*) zum Thema haben, konnte eine positive Korrelation zwischen Lungenkrebsrisiko und dem homozygoten Tragen des Allels (*OGG1* 326Cys) des SNP *OGG1* Ser326Cys festgestellt werden. Des Weiteren konnte für Träger des Allels (*XRCC1* 194Trp) im Zusammenhang mit Tabakkonsum ein protektiver Effekt festgestellt werden, während homozygoter Status des Allels (*XRCC1* 399Gln) für leichte Raucher das Lungenkrebsrisiko erhöht, gleichzeitig aber für starke Raucher ein geringeres



Risiko bedeutet. Für die Polymorphismen *XRCC1* Arg280His und *APE1 / APEX1* Asp148Glu konnte kein Zusammenhang zu Lungenkrebsrisiken festgestellt werden (Hung *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in einer Kooperationsstudie zwischen dem FB Strahlenschutz und Gesundheit im Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) in München / Neuherberg, dem Institut für Epidemiologie im Helmholtz Zentrum München und der Abteilung Genetische Epidemiologie der Georg-August-Universität Göttingen, in Untersuchungen von Lymphozyten junger Lungenkrebspatienten, die an der LUCY-Studie teilnehmen, eine Korrelation zwischen leicht verminderter DNA-Reparaturkapazität im alkalischen *Comet Assay* und dem Allelstatus des SNP *XRCC1* Arg280His festgestellt werden. Vier Patienten, die leicht reduzierte Reparatur zeigten, besitzen das seltene Allel (*XRCC1* 280His) in mindestens einer Kopie (drei sind heterozygot, einer ist homozygot), wohingegen ein Patient, der homozygot das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) trägt, überdurchschnittliche Reparatur zeigte. Diese bisher unveröffentlichten Informationen wurden im Rahmen einer persönlichen Absprache für die Ausführung der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt und bilden die Basis für eine weiterführende Untersuchung von Zelllinien, die für den SNP *XRCC1* Arg280His genotypisiert sind.

Die Ergebnisse solcher Studien bestätigen die Theorie, dass SNP als Marker für das Risiko, an Krebs zu erkranken, dienen können, allerdings müssen immer umweltbedingte Faktoren, z. B. der Raucherstatus, berücksichtigt werden.

### **2.3.2 Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg**

Als Kontroll-Kollektiv mit verschiedenen Proben gesunder Spender wird das Kollektiv der KORA-Studie eingesetzt. KORA ist eine populationsbasierende Studie, in der Bioproben von klinisch unauffälligen und somit gesunden Individuen gesammelt werden (Löwel *et al.*, 2005). Sie setzt seit 1996 in erweiterter Form die 1984 begonnene MONICA (*Monitoring of Trends and Determinations of Cardiovascular Disease*) -Studie fort. In bisher vier Erfassungsrunden S1 bis S4 (1984 bis 2004) konnten etwa 18000 erwachsene Spender im Alter von 25 bis 74 Jahren bei Aufnahme in die Studie erfasst werden. Alle Probanden leben in Augsburg oder in der Umgebung von Augsburg.

Für DNA-Proben eines Sub-Kollektivs wurden Genotypisierungen für SNP in einer Vielzahl von Genen durchgeführt. Die Information über den Allelstatus des SNP *XRCC1* Arg280His stand für ein Teil-Kollektiv der analysierten Proben zur Verfügung. In der vorliegenden

Arbeit werden Analysen an Proben von KORA-Individuen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme jünger als 50 Jahre sind, durchgeführt, um ein vergleichbares Kollektiv zu den Proben des LUCY-Kollektivs zu erhalten.

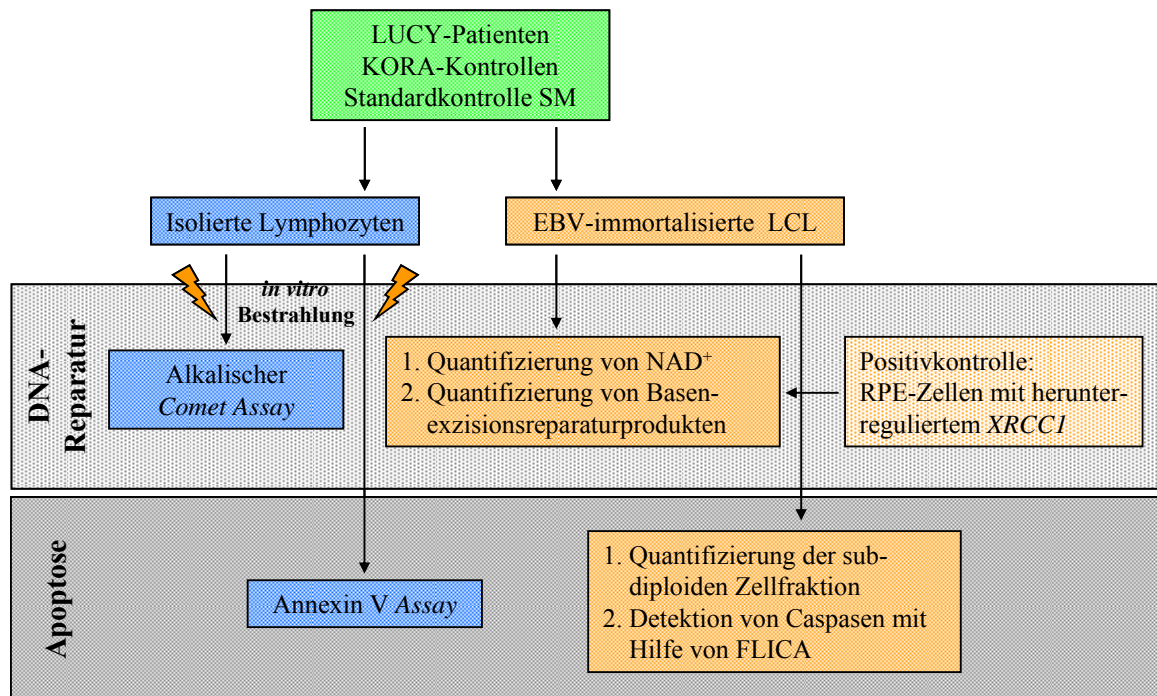
## **2.4 Fragestellung**

In dieser Arbeit sollen durch Anwendung mehrerer unabhängiger Verfahren auf zellbiologischer Ebene Proben eines Kollektivs junger Lungentumorm Patienten mit Proben eines gesunden Kontroll-Kollektivs bezüglich der Strahlenempfindlichkeit verglichen werden. Diese Verfahren sollen an einer limitierten Anzahl isolierter Blutzellen aus Patienten / Probanden anwendbar sein, um in den verfügbaren Mengen an Probenmaterial eine Aussage zur unterschiedlichen Strahlenantwort in den beiden Kollektiven zu ermöglichen. Die gewählten Verfahren sind hierbei der alkalische *Comet Assay* nach ionisierender Bestrahlung zur Analyse der SSB-Reparatur und der durchflusszytometrische Annexin V-Assay nach ionisierender Bestrahlung, der zur Untersuchung der Apoptoseraten verwendet wird. Für Proben, für die im Annexin V-Assay auffällig hohe oder auffällig niedrige Apoptoseraten gefunden werden, soll mit Hilfe von aus diesen Proben gewonnenen lymphoblastoiden Zelllinien (*lymphoblastoid cell lines*, LCL) getestet werden, ob das Verhalten nach ionisierender Bestrahlung von primären Lymphozyten vergleichbar ist mit dem Verhalten von LCL.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen an Zelllinien, die aus Proben des Kollektivs junger Lungenkrebspatienten und des Kontroll-Kollektivs hergestellt wurden, Untersuchungen zu dem in der BER wichtigen Gen *XRCC1* durchgeführt werden. Zum einen soll untersucht werden, ob für den SNP *XRCC1* Arg280His in der BER funktionelle Bedeutung nachgewiesen kann. Dies geschieht mit Hilfe eines Versuches zur Verarmung an NAD<sup>+</sup> während Reparaturereignissen sowie der Quantifizierung von radioaktiv markierten BER-Produkten. In Abbildung 6 ist der Aufbau der Studie schematisch dargestellt.

Die Analysen werden an primären Lymphozyten nach ionisierender Bestrahlung (blau markiert) und lymphoblastoiden Zelllinien (dunkelorange) des LUCY-Kollektivs und der KORA-Kohorte (grün) sowie einer internen Laborkontrolle, die von einer gesunden Spenderperson stammt, durchgeführt. Zur Untersuchung der primären Lymphozyten werden Daten im alkalischen *Comet Assay* bezüglich der SSB-Reparatur (hellgrau unterlegt) erhoben, im durchflusszytometrischen Annexin V-Assay bezüglich der Apoptoseraten (dunkelgrau). Anhand der im Annexin V-Assay auffälligen Proben werden lymphoblastoide Zelllinien

hergestellt, deren Apoptoseverhalten mit Hilfe der Quantifizierung der sub-diploiden Zellfraktion und der Detektion von Caspasen durch einem mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Caspaseinhibitor (FLICA, *fluorochrome labeled caspase inhibitor*) ermittelt wird.



**Abbildung 6: Aufbau der Studie.**

In grün dargestellt sind die Proben-Kollektive, die für die Ausführung der verschiedenen Versuche zur Verfügung gestellt wurden. Blaue Farbe kennzeichnet die Analysen, die an primären Lymphozyten durchgeführt wurden, orange diejenigen, die in lymphoblastoiden Zelllinien ausgeführt wurden. Die hellgrau markierte Fläche umfasst Experimente zur Untersuchung der DNA-Reparatur, die dunkelgraue Fläche entsprechend die Versuche zur Analyse des Apoptoseverhaltens.

Zur weiteren Analyse der SSB-Reparatur werden lymphoblastoide Zelllinien herangezogen, die verschiedenen Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His aufweisen. Als Positivkontrolle diente hierbei eine immortalisierte Epithelzelllinie, für die mittels RNAi Technik eine transiente Herunterregulierung von *Xrcc1* bewirkt wurde.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte, Membranen und Filme

Agarosegelelektrophorese-Apparatur	(Wide-Mini-) Sub Cell GT, Biorad, München
Agarosegelelektrophorese-Apparatur ( <i>Comet Assay</i> )	Sonderanfertigung durch die Werkstatt des Helmholtz Zentrums München
Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA	Quick Spin Columns (G-25 Sephadex Columns for Radiolabeled DNA Purification), Roche Applied Science, Indianapolis
Bestrahlungsanlage	HWM-D 2000, Nuklid: $^{137}\text{Cs}$ , Aktivität: 2x74 TBq (1983) Hans Wälischmiller GmbH, Markdorf
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD <i>Semi-Dry Transfer Cell</i> , Biorad, München
Blotting-Papier	Whatmann 3 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Cryoröhrchen	Kisker-Biotech, Mühlhausen
Durchflusszytometer	BD LSR II ( <i>Scanner</i> ), Becton Dickinson, USA
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen
Photometer	BioFotometer, Eppendorf, Hamburg
Geldokumentation	GelDoc 2000, Biorad, München
Glaswaren	Braun, Melsungen Schott, Mainz
Inkubationsschränke	Heraeus, Hanau Memmert, Schwabach Sanyo, Japan
Kanülen	Braun, Melsungen
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr GmbH, Lienz Privileg, Quelle, Fürth Sanyo, Japan
Küvetten	Brand, Wertheim Uvette 220-1600 nm, Eppendorf, Hamburg
Leucosep <sup>®</sup> -Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Light Cycler	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Loch-Platten	96, 24, 12, 6; Falcon, USA
Magnetrührer	Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
Mikroskope	Axiovert 25CF, Zeiss, Jena LSM 510, Zeiss, Jena Olympus LH50A, Olympus Optical Co., Hamburg
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Nitrozellulose Membranen	Protran 0,2 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
PAGE-Apparaturen	Hoefer Mighty SmallTM SE245, Dual Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Geräte	Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Primus, MWG, Biolab, Ebersberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Aerosol resistant, Molecular Bioproducts, USA Eppendorf, Hamburg

pH-Meter	InoLab pH Level 1, UK
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, Eppendorf Hamburg 15 ml, 50 ml, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen FACS-Röhrchen, Falcon, USA PCR-Gefäße, Biozym Diagnostik GmbH, Hess-Oldendorf
Röntgenfilme	WICO Rex® B+, Typon Imaging AG, Burghard
Röntgenfilmentwickler- maschine	Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Wiesloch
Scanner	Umax, PowerLook 1000, Willich
Schüttler	KS 250 Kreisschüttler, IKA Labortechnik, Staufen Roto-Shake Genial, Scientific Industries Inc., USA Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg Vortex, Bender & Hobein AG, Schweiz
Spannungsquellen	Biorad, München Consort electrophoresis power supply, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau Elektrophoresis Power Supply – EPS600, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spritzen	Becton Dickinson, USA
Sterilbänke	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau Laminar Flow, BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Vakuumpumpe	VacUubrad RS-4, F.Schultheiss, München
Wasserbad	Frigomix U1, Braun, Melsungen
Wipptisch	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Zellkulturflaschen	50 ml, 250 ml, 650 ml, Greiner Labortechnik Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Durchmesser: 6 cm, 10 cm, Nunc, Dänemark
Zellzahl-Messgerät	Coulter Z1, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Eppendorf centrifuge 5415c, Eppendorf, Hamburg Multifuge 3SR, Heraeus, Hanau Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

### 3.1.2 Software

Abbildungen	Photoshop 7.0, Adobe Inc. Microsoft® Power Point 2002, Microsoft Quantity One®, Biorad, München <a href="http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/">http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/</a> ImageMaster TotalLab, Amersham, UK <a href="http://www.dharmacom.com">www.dharmacom.com</a> Viscomet 1.2, T.I.L.L. Photonics GmbH & Impuls GmbH, Martinsried
Geldokumentation	FACSDiva, Becton Dickinson, USA
Literaturrecherchen	Microsoft® Excel 2002, Microsoft
Quantitative Auswertung von Röntgenfilmen	Microsoft® Word 2002, Microsoft
siRNA-Auswahl	
Software <i>Comet Assay</i>	
Software FACS	
Tabellenkalkulation und Diagramme	
Textverarbeitung	

### 3.1.3 Chemikalien

Acrylamid / BisAA 30% / 0,8% (Protogel™)	National Diagnostics, Atlanta, USA
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (1x10 <sup>6</sup> dpm / pmol)	Hartmann
Agarose Art. Nr. 11408 (1)	Serva, Heidelberg
Agarose 3:1 (E776) (2)	Amresco, USA
Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
APS	Merck KG aA, Darmstadt
<i>Binding buffer for apoptosis assays</i>	Caltag Laboratories, Hamburg
<i>Biocoll Separation Solution (Isotonic Solution, 1,077 g / ml)</i>	Biochrom AG, Berlin
Borsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Bradfordreagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Molecular Diagnostics, Mannheim
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Caspaseinhibitor: CaspACE™ FITC-VAD-FMK	Promega
<i>In Situ Marker</i>	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
ddTTP (wässrige Lösung, 10 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
DMEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMEM-F12	Gibco BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Eisessig	Merck KG aA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KG aA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	PAA Laboratories, Österreich
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG aA, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magermilchpulver	Dr. Groß GmbH; Sauerlach
Magnesiumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KG aA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt
Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
MMS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe

### Phosphate Buffered Saline

PMS

PMSF

Ponceau S

Propidiumiodid

Proteasehemmercocktail

Protogel™

Recombinant human Annexin V

Restore™ Western Blot Stripping Buffer

RPMI 1640

Roti® Block

Salzsäure

SDS

SiLent Lipid Fect

T4 Polynucleotidkinase

TEMED

Trichloressigsäure (TCA)

Tris

Triton X-100

Trizol

Trypsin / EDTA-Solution 0,25% / 0,02% (w / v)

Tween-20

Vectashield – mounting medium

Wasserstoffperoxid

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Sigma, USA

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

National Diagnostics, Atlanta, USA

Caltag Laboratories, Hamburg

Pierce, Rockford, USA

PAA Laboratories, Österreich

Roth GmbH, Karlsruhe

Merck KG aA, Darmstadt

Serva, Heidelberg

Biorad

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

Merck KG aA, Darmstadt

Merck KG aA, Darmstadt

Merck KG aA, Darmstadt

Invitrogen, Karlsruhe

Biochrom AG, Berlin

Merck KG aA, Darmstadt

Linaris, Wertheim

Merck KG aA, Darmstadt

### 3.1.4 Kits

ECL Advanced Western Blotting Detection Kit

LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR

Green I

QuantiTect Rev. Transcription Kit

siLentFect™ Lipid Reagent

Taq DNA-Polymerase

Amersham Biosciences

Roche, Penzberg

Qiagen, Hilden

BioRad, Hercules, USA

Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.5 Enzyme

Alkoholdehydrogenase (ADH)

Alkalische Phosphatase

Creatinphosphokinase (CPK)

T4-DNA-Ligase

Restriktionsendonukleasen und zugehörige

Puffer

RNase A

SuperScript Reverse Transkriptase

Taq DNA-Polymerase

New England Biolabs, Frankfurt a. Main

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Invitrogen, Karlsruhe

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

New England Biolabs, Frankfurt a. Main

Roche Molecular Diagnostics, Mannheim

Sigma, Deisenhofen

Invitrogen, Karlsruhe

Gibco BRL, Eggenstein, Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.6 Antikörper

Anti-Actin, polyklonal, IgG (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-CD3, monoklonal, Allophycocyanin-konjugiert (Maus)	Caltag Laboratories, Hamburg
Anti-CD19, monoklonal, Allophycocyanin-konjugiert (Maus)	Caltag Laboratories, Hamburg
Anti-Tubulin Ab-2 (Maus)	NeoMarkers, USA
Anti-Xrcc1, monoklonal, IgG (Maus)	Novus Biologicals
Esel-anti-Ziege, IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Ziege-anti-Kaninchen, IgG, HRP-konjugiert (400 µg / ml)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Ziege-anti-Maus, IgG, HRP-konjugiert (400 µg / ml)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

### 3.1.7 Längenstandards

1 kb DNA-Längenstandard	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
100 bp DNA- <i>Ladder</i>	Plasmid Factory GmbH&Co. KG, Bielefeld
2-log DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Prestained SDS-PAGE Standard low range</i>	Biorad, München

### 3.1.8 Oligonukleotide

<b>BER1</b>	5' - GCCCTGCAGGTCTGAUTCTAGAGGATCCCCGGGTAC - 3'
<b>BER2</b>	5' - GTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGGC - 3'
<b>XRCC1-280-1</b>	5' - CCTTATCTCGCAGCTCGGAG - 3'
<b>XRCC1-280-2</b>	5' - CTGGGGGTTGACCCCCAGTG - 3'

**XRCC1:** Hs\_XRCC1\_SG\_1 QuantiTect® *Primer Assay*

bestellt bei der Firma Qiagen, Hilden  
keine Sequenzangaben

### 3.1.9 Chemisch synthetisierte siRNAs

Kontroll-siRNA (negative Kontrolle)  
bestellt bei der Firma Qiagen, Hilden  
keine Sequenzangaben

#### siRNA XRCC1\_1

5' - GGGAAGAGGAAGUUGGAUUTT - 3'  
5' - AAUCCAACUUCUCUUCCTT - 3'

#### siRNA XRCC1\_2

5' - GCUCGAGGACUAUAUGAGUTT - 3'  
5' - ACUCAUAUAGUCCUCGAGCTT - 3'



### 3.1.10 Lösungen und Puffer

#### 0,1% und 0,5% LM-Agarose (Comet Assay)

0,1% (1) bzw. 0,5% (2) Agarose in 0,9% NaCl resuspendieren  
im Wasserbad bei 37 °C 10 min quellen lassen  
dreimal in der Mikrowelle aufkochen lassen, zwischendurch mischen  
bis zur Verwendung bei 50 °C flüssig halten

#### Alkoholdehydrogenase (ADH) (180 U / ml)

4 mg in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### Annexin V-Lösung (Annexin V-Assay)

2% *Recombinant human Annexin V* (konjugiert mit FITC)

0,01% PI

in 1 : 4 verdünntem *binding buffer for apoptosis assays*

#### Antikörperlösung (Annexin V-Assay)

12% CD3 monoklonale Maus-Antikörper (konjugiert mit Allophycocyanin)

12% CD19 monoklonale Maus-Antikörper (konjugiert mit Allophycocyanin)

in PBS

#### 10% (w / v) AMPS

1 g auf 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### 5 x BER-Puffer (BER-Assay)

250 mM HEPES (pH 7.5)

2,5 mM EDTA

10 mM DTT

100 mM KCl

20 mM ATP

25 mM Phosphokreatin

2,5 mM NAD

0,5 mM ddTTP

Lagerung bei -20 °C möglich

Vor Verwendung 100 µg / ml Kreatinphosphokinase (PCK) frisch zugeben

#### BER-TBE (BER-Assay)

5,34 ml 1 M Tris pH 8.8

5,34 ml 1 M Borsäure

0,24 ml 0,5 M EDTA

#### Blockpuffer für Antikörperdetektion (Western Blot)

8% Magermilchpulver in 1 x TBS-T lösen

#### Caspaseinhibitor-Lösung

0,2% CaspACE™ FITC-VAD-FMK *in situ* Marker

in PBS

#### Kreatinphosphokinase (5,6 mg / ml CPK)

500 U (2,8 mg) in 0,5 ml 5 mM Glycin, pH 9,0 / 50% Glycerin lösen

Lagerung bei -20 °C möglich

DEPC-Wasser

0,1% (v / v) DEPC in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, autoklavieren

dNTP-Mix

dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP-Stammlösungen zu gleichen Teilen mischen

Konzentrationen der dNTPs im Mix:

[dATP] = [dCTP] = [dGTP] = [dTTP] = 10 mM

6 x DNA-Auftragspuffer in TE-Puffer

50% (w / v) Saccharose

0,1% (w / v) Bromphenolblau

DNA-Auftragspuffer (BER-Assay)

95% Formamid

20 mM EDTA

0,02% (w / v) Bromphenolblau

0,02% Xylencyanol

1 M EDTA (pH einstellen)

292,2 g EDTA

auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

pH-Wert mit NaOH einstellen

Elektrophorese-Puffer (Comet Assay)

300 mM NaOH

2% DMSO

10 mM Na<sub>4</sub>EDTA

Färbelösung (Comet Assay)

5% DMSO

16,5% Vectashield

0,08% SYBR-Green

Kaliumphosphatpuffer (Quantifizierung von NAD<sup>+</sup>)

100 mM Kaliumphosphat pH 7.4

3% Trichloressigsäure

Laemmli Auftragspuffer

100 mM Tris-HCl pH 6,8

4% SDS

0,2% Bromphenolblau

20% Glycerin

200 mM DTT (immer frisch zugeben)

5 x Laemmli Laufpuffer

15,1 g Tris-Base (25 mM)

94 g Glycin (250 mM)

50 ml 10% SDS Stammlösung (0,1 %)

auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Lösung I (Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion)

584 mg / ml NaCl

1 g / l NaCitrat

0,3 ml / l NP-40

10 mg / l RNase A (frisch zugeben)

10 µg / ml PI (frisch zugeben)

Lösung II (Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion)

15 g / l Zitronensäure

0,25 M Saccharose

10 µg / ml PI (frisch zugeben)

Lysepuffer I (Comet Assay)

Lysepuffer II

1% *Sodium Lauryl Sarcosinate* (SLS)

1% Triton-X-100

pH 10

Lysepuffer II (Comet Assay)

2,5 M NaCl

100 mM NaEDTA, pH 10

10 mM Tris / HCl

steril filtrieren

NaCl-Lösung, isoton

0,9% (w / v) NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

steril filtrieren

Neutralisationspuffer (Quantifizierung von NAD<sup>+</sup>)

800 mM KOH

200 mM Tris

18% PAA Gel (denaturierend, BER-Assay)

18% AA / BisAA 20% / 1%

8 M Urea

89 mM Tris-HCl (pH 8,8)

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

0,1% APS

0,005% TEMED

PBS (*Phosphate buffered saline*)

9,6 g PBS lösen in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, autoklavieren

Puffer I (BER-Assay)

10 mM Tris-HCl, pH 7,8

200 mM KCl

Proteaseinhibitor-Cocktail (frisch 10 µl pro 1 ml Puffer I zugeben)

Puffer II (BER-Assay)

10 mM Tris-HCl, pH 7.8

200 mM KCl

2 mM EDTA

40% Glycerin

0.2% NP-40

2 mM DTT

Proteaseinhibitor-Cocktail (frisch 10 µl pro 1 ml Puffer II zugeben)

PonceauRotS Färbelösung

0,2% (w / v) PonceauRotS in 5 % Trichloressigsäure lösen

Reaktionsmix (Quantifizierung von NAD<sup>+</sup>)

100 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer

0,02 g MTT-Pulver (ca. 500 µM)

0,0082 g PMS

3,06 ml Ethanol (560 mM)

bei 4 °C lagern, vor Licht schützen!

10 x Reaktionspuffer A (BER-Assay)

500 mM Tris-HCl (pH 7,6)

100 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM DTT

1 mM Spermidin

1 mM EDTA

RIPA-Puffer - Lysepuffer für Säugerzellen

150 mM NaCl

10 mM Tris-Lösung, pH 7,2

0,1% SDS

1% Triton X-100

1% Desoxycholat

5 mM EDTA

SDS-PAGE

10% Trenngel

375 mM Tris-Lösung pH 8,8

10% Acrylamid / Bisacrylamid (37,5% / 1%) (Protogel™)

0,1% SDS-Lösung

0,1% APS

0,01% TEMED

5% Sammelgel

125 mM Tris-Lösung pH 6,8

5% Acrylamid / Bisacrylamid (37,5% / 1%) (Protogel™)

0,1% SDS-Lösung

0,1% APS

0,01% TEMED

10 x TBS-T

20 mM Tris-Base (2,4 g / l)

137 mM NaCl (8 g / l)

0,1% Tween 20 (1 ml / l)

pH 7,6

Towbin-Puffer (für Western Blot)

3 g Tris-Base

14,4 g Glycin

in H<sub>2</sub>O lösen

200 ml Ethanol

auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>**3.1.11 Säugerzelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>hTERT-RPE</b>	Clontech Invitrogen; L. Hieber, GSF
<b>Lymphoblastoide Zelllinien (LCL):</b>	W. Sauter, EPI, GSF
<b>Laborkontrollen:</b> SiMö, DaSa	
<b>XRCCI Arg280His:</b> <b>LUCY:</b> <u>8008-200</u> , <u>8062-200</u> , <u>12006-200</u> , <b>13019-200</b> , <u>13058-200</u> , <u>13070-200</u> , <u>14017-200</u> , <u>17001-200</u> , <b>19021-200</b> , <u>19033-200</u> <b>KORA:</b> <b>1839369</b> , <u>1827485</u> , <b>1836750</b> , <u>1824755</u> , <u>1820899</u> , <u>1821598</u> , <u>1829387</u> , <u>1817793</u> , <u>1820634</u> , <b>1832920</b> , <u>1846617</u> , <u>1840677</u> , <u>1815297</u> , <u>1811437</u>	<b>XRCCI Arg280His:</b> <b>AA</b> , <b>AG</b> , <b>GG</b>
<b>Apoptose:</b> <b>LUCY:</b> <u>8042-200</u> , <u>8027-200</u> , <u>29023-200</u> , <u>29031-200</u> , <u>4047-200</u> , <u>29012-200</u> , <u>12018-200</u> , <u>29019-200</u> , <u>29011-200</u> <b>KORA:</b> <u>1452843</u> , <u>1467846</u> , <u>1434457</u> , <u>1442168</u> , <u>1420961</u> , <u>1467304</u> , <u>1412132</u> , <u>1829455</u> , <u>1416785</u> , <u>1848770</u> , <u>1842418</u> , <u>1813714</u> , <u>1852505</u> , <u>1810461</u> , <u>1830005</u> , <u>1819645</u>	

**3.1.12 Medien für die Aufzucht von Säugerzellen**

hTERT-RPE (im Folgenden als RPE-Zellen bezeichnet)	DMEM-F12 (1:1) 10% FCS 17,3 ml 7,5% Natriumbicarbonatlösung 40 U / ml Penicillin, 40 µg / ml Streptomycin
Primäre Lymphozyten	RPMI 1640 20% FCS 40 U / ml Penicillin, 40 µg / ml Streptomycin
LCL	RPMI 1640 20% FCS 40 U / ml Penicillin, 40 µg / ml Streptomycin

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Kultur von Säugerzelllinien**

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) werden je nach gewünschter Zellzahl und -dichte in senkrecht stehenden Zellkulturflaschen bzw. -schalen mit der passenden Größe kultiviert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Zur Passage werden die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt, ein der gewünschten Zellzahl entsprechendes Volumen entnommen und in ein neues Gefäß mit frischem Kulturmedium überführt. Die Passage erfolgt zwei- bis dreimal pro Woche.

Adhärente Zellen werden entsprechend bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in liegenden Zellkulturflaschen bzw. -schalen kultiviert. Um sie vom Schalenboden abzulösen für nachfolgendes Passagieren, Ernten oder Einfrieren, werden sie mit Trypsin behandelt. Durch Waschen mit PBS wird zunächst das FCS - haltige Medium vollständig entfernt, da FCS die Trypsinreaktion behindert. Nach Zugabe von Trypsin wird für etwa 5 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird Medium mit 10% FCS in mindestens fünffacher Menge zugegeben. Um die Zellen zu vereinzeln und komplett vom Boden zu lösen, wird der Boden mehrfach mit der Zellsuspension abgespült. Zur weiteren Kultivierung werden die Zellen in neue Kulturgefäße überführt.

Die Ernte der Zellen erfolgt durch Überführen in 15 ml Röhrchen und anschließende Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT).

#### **3.2.1.2 Gefrierkultur von Säugerzellen**

Zur Lagerung der LCL wird das abzentrifugierte Sediment zunächst in 0,5 ml Einfriermedium ohne DMSO (Kulturmedium mit 40% FCS) resuspendiert, danach werden 0,5 ml Einfriermedium mit DMSO (Kulturmedium mit 40% FCS, 20% DMSO) zugegeben. Im Anschluss wird die Zellsuspension in *Cryoröhrchen* überführt. Um ein für Säugerzellen wichtiges langsames Einfrieren zu gewährleisten, werden die Röhrchen in einen *Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container* gegeben, der mit Isopropanol gefüllt ist, und ÜN bei -80 °C inkubiert. Am folgenden Tag werden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zellen aus eingefrorenen Kulturen werden in den Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C angetaut und in 10 ml kaltem Kulturmedium gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Das abzentrifugierte Sediment wird in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in einer Kulturflasche ausgesät.

### **3.2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung pro ml erfolgt durch Vermischen von 500 µl Zellsuspension mit 19,5 ml 0,9 M NaCl und anschließender Messung im *Coulter Counter Z1*. Da die Verdünnung und andere Parameter bereits berücksichtigt sind, gibt das Gerät die Zellzahl pro ml Ausgangssuspension an. Für jede Messung wird eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert verwendet.

### **3.2.1.4 Gewinnung und Gefrierkultur von primären Lymphozyten**

Die Gewinnung von primären Lymphozyten aus Spenderblut erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation. Es werden zunächst Leucosep-Röhrchen (50 ml, mit Filter) mit jeweils 15 ml Ficoll befüllt und für 1 min bei 1000 x g, RT abzentrifugiert. Das Spenderblut kann im Anschluss daran aus der Monovette direkt auf den Filter gekippt und für 10 min bei 1000 x g abzentrifugiert werden. Durch den Ficollgradienten und die Filterschicht liegen nun die Lymphozyten oberhalb des Filters, die Erythrozyten unterhalb des Filters. Die Lymphozytenschicht wird danach in 5 ml Kulturmedium (RT) gewaschen und für 10 min bei 250 x g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment wird erneut in 5 ml Kulturmedium (RT) aufgenommen, um eine Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 3.2.1.3) durchführen zu können. Abermals erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 250 x g (RT). Die Zellen werden nun mit einer Zellzahl von  $3 - 5 \times 10^6$  nach Kapitel 3.2.1.2 eingefroren.

Vor Beginn eines Versuchs werden die in Stickstoff gelagerten Lymphozyten analog zu Kapitel 3.2.1.1 in Kultur genommen.

### **3.2.1.5 Immortalisierung der primären Blutzellen durch das Epstein-Barr-Virus**

Die Herstellung der lymphoblastoiden Zelllinien erfolgt im Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München unter Verwendung der Marmoset-Lymphozytenlinie B95-8, welche eine geeignete Epstein-Barr-Virus (EBV) Variante produziert.

### **3.2.1.6 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Noxen**

#### ***3.2.1.6.1 Behandlung mit Methylmethansulfonat***

Für die Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS), welches DNA methyliert (Grzesiuk, 1998; Wyatt und Pittman, 2006), werden die Zellen mit definierten Zellzahlen ausgesät und im Anschluss mit MMS versetzt. Um die optimale Dosis für den jeweiligen Versuch festzustellen, werden Dosisreihen mit verschiedenen Dosen zwischen 0 mM und 3 mM (Stammlösung: 11,8 M, Verdünnung erfolgt in entsprechendem Volumen Zellkulturmedium) durchgeführt. Die Inkubation findet für 120 min bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> statt. Für Zeitreihen wird eine Dosis von 1 mM bzw. 2 mM gewählt und die Zellen werden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min bis 240 min) nach Zugabe von MMS für die nachfolgenden Versuche geerntet.

#### ***3.2.1.6.2 Bestrahlung mit einer $\gamma$ -Quelle***

Die Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung erfolgt für den *Comet Assay* in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis, um einen vorzeitigen Reparaturvorgang zu verhindern. Für alle weiteren Versuche werden die Zellen in Zellkulturgefäßen, die in eine Styroporschachtel gestellt werden, um ein zu plötzliches Abkühlen der Zellen zu vermeiden, zur Bestrahlungsanlage gebracht und bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Strahlenquelle ist eine  $\gamma$ -Quelle mit <sup>137</sup>Cs mit einer Dosisleistung von 0,56 Gy / min.

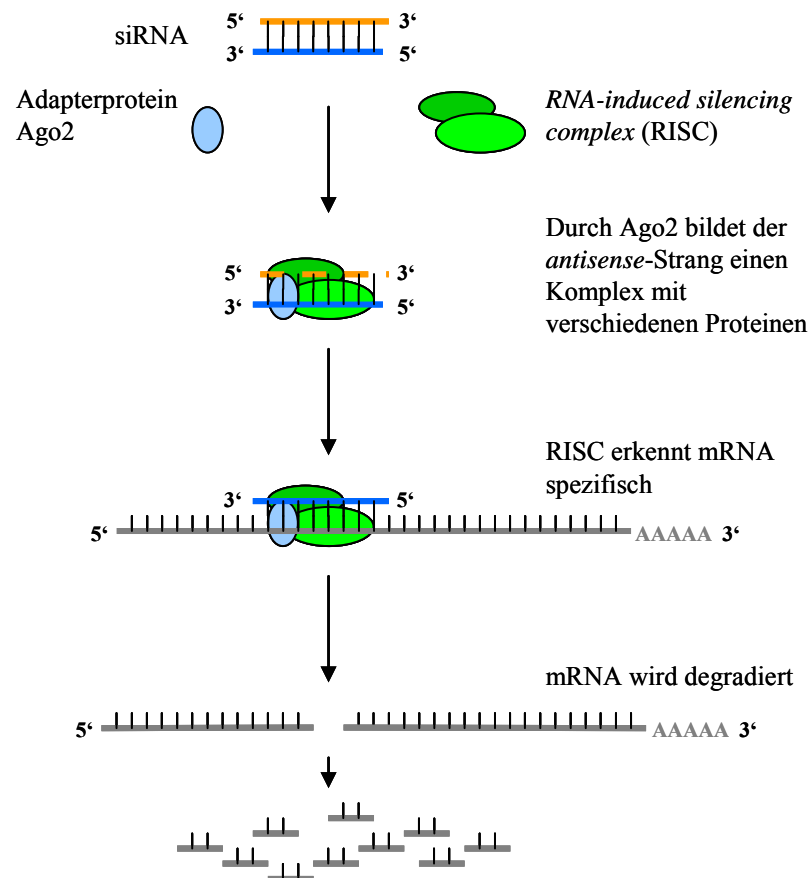
### **3.2.2 RNA Interferenz (RNAi): post-transkriptioneller *knockdown* spezifischer Gene durch chemisch synthetisierte siRNA**

Der Begriff RNA Interferenz oder RNAi wurde im Labor von A. Fire (Fire et al., 1998) geprägt. Sie stellten fest, dass doppelsträngige RNA (dsRNA), die *Caenorhabditis elegans* zugeführt wird, die Funktion von endogenen Genen, die homologe Sequenz zu der dsRNA aufweisen, beeinflussen kann.

Es handelt sich bei der RNAi um ein natürliches System, das in Eukaryoten konserviert ist und auch als „Immunsystem des Genoms“ bezeichnet wird (Plasterk, 2002). Sie findet posttranskriptionell statt und basiert auf sequenzspezifischer RNA-Degradierung. Durch sie kann das Genom eines Organismus vor mobilen genetischen DNA-Elementen (Transposons) und Viren, die häufig während der Replikation dsRNA bilden, geschützt werden (Tuschl, 2001).



Die RNA-Interferenz Technik mittels synthetisch hergestellter siRNAs ist im Labor ein etabliertes System, um gezielt und effizient die Genexpression herunterzuregulieren und zu untersuchen. siRNAs sind 21 - 23 nt lange DNA-Fragmente, weisen am 5' - Ende einen Phosphatrest auf und haben einen 3' - Überhang. Sie können über das Adapterprotein Ago2 mit verschiedenen weiteren Proteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC) bilden (Abbildung 7).



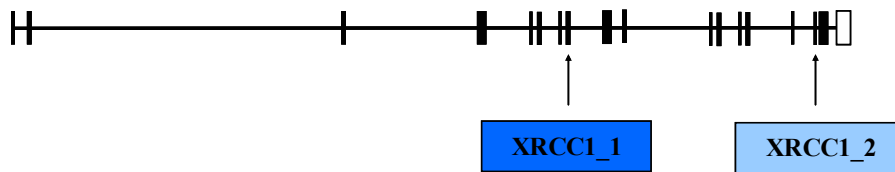
**Abbildung 7: Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) durch chemisch synthetisierte siRNAs.**

Chemisch synthetisierte siRNAs werden in die Zielzelle eingebracht. Mit Hilfe des Adapterproteins Ago2 wird der *RNA-induced silencing complex* (RISC) mit dem *antisense*-Strang der siRNA gebildet. Durch Paarung mit der homologen Ziel-mRNA wird die endonukleolytische Spaltung dieser eingeleitet.

Dieser Komplex erkennt mit Hilfe des gebundenen *antisense*-Strangs der siRNA die Ziel-mRNA Sequenz und leitet in diesem Bereich den endonukleolytischen Abbau der Ziel-mRNA ein. Durch die freiliegenden Schnittenden können nun Exonukleasen die mRNA degradieren.

### 3.2.2.1 Herunterregulierung der Aktivität von *XRCC1*

Um die Auswirkungen eines Verlusts von *Xrcc1* auf Säugerzellen zu untersuchen, werden zwei unterschiedliche siRNAs ausgewählt (Abbildung 8), die sich idealerweise in unterschiedlichen Exons befinden. Für die jeweiligen siRNAs wird dann die Effizienz der Gensuppression auf RNA-Ebene und auf Proteinebene getestet. Als Kontrolle erfolgt die Transfektion mit Oligonukleotiden, die keine Homologie zu humanen Sequenzen aufweisen (im Folgenden siNeg) und somit nur eine scheinbare Transfektion (*mock* Transfektion) vermitteln.



**Abbildung 8: Lokalisierung der ausgewählten siRNAs im *XRCC1*-Gen.**

Die Längsbalken symbolisieren die Exons des Gens. 3' - UTR (*untranslated region*) steht für eine Region am 3' Ende, die nicht translatiert wird.

### 3.2.2.2 Auswahl der geeigneten siRNA Sequenzen

Für das zu untersuchende Gen *XRCC1* werden zunächst RNA Sequenzen gesucht, die geeignet erscheinen. Die Auswahl der geeigneten siRNAs erfolgt unter Zuhilfenahme der Internetseite der Firma Dharmacon (<http://www.dharmacon.com>), die entsprechende Software zur Verfügung stellt. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Sequenzen einen GC - Gehalt von 35 - 52% aufweisen. Sie sollten 21 nt lang sein und im kodierenden Bereich des Zielgens, jedoch 50 - 100 nt vom Startcodon entfernt liegen (Elbashir *et al.*, 2002). Das 5' - Ende sollte eher GC reich sein, das 3' - Ende dagegen AT reich, um zu erreichen, dass Helikasen, die im RISC Komplex wirken, möglichst das 3' - Ende aufwinden, so dass im RISC Komplex der *antisense* Strang verbleibt. Um zu vermeiden, dass siRNAs gewählt werden, die weitere Gene beeinflussen können, wird mit Hilfe von BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) gegen eine cDNA-Bibliothek des menschlichen Genoms getestet, um mögliche Übereinstimmungen mit anderen Genen auszuschließen. Als Kontrolle werden Oligonukleotide ausgewählt, die keine Homologie zu humanen Sequenzen aufweisen.

### 3.2.2.3 Hybridisierung chemisch synthetisierter siRNAs

Chemische synthetisierte siRNAs liegen zunächst als Einzelstränge vor und müssen daher vor Verwendung hybridisiert werden. Die Lyophilisate beider Stränge (*sense* und *antisense*) werden zunächst jeweils in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst, um eine Lösung mit einer Konzentration von 100 µM zu erhalten. Im Anschluss daran werden *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide vermischt und mit 50 µl 5 x *annealing buffer* versetzt. Hieraus ergibt sich eine siRNA-Konzentration von 80 µM.

Die Lyophilisate der Kontroll-siRNAs (Qiagen) werden jeweils in 250 µl *suspension buffer* gelöst, hieraus resultiert eine Konzentration von 20 µM.

Um möglicherweise entstandene Aggregate aufzulösen, werden die siRNAs, nachdem sie gelöst sind, für 1 min auf 90 °C erhitzt. Die Hybridisierung der beiden komplementären Oligonukleotide erfolgt dann durch Inkubation für 1 h bei 37 °C. In diesem Zustand können die siRNAs bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

### 3.2.2.4 Transfektion von adhärenenten Säugerzellen (mit chemisch synthetisierten siRNAs)

Transfektion von Säugerzellen mit spezifischen siRNAs kann durch liposomvermittelte Endozytose, z. B. mit *Biorad SiLent Lipid Fect* erreicht werden. Die Mengenangaben beziehen sich bei diesem Versuch immer auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm, bei größeren oder kleineren Kulturgefäßen müssen sie entsprechend angepasst werden.

Es werden pro Ansatz etwa  $8 \times 10^4$  Zellen der hTERT-RPE-Linie in eine Kulturschale ausgesät, so dass sie am nächsten Tag, an dem die Transfektion erfolgt, eine Konfluenz von 50 - 70% erreichen können. 15 - 60 min vor der Transfektion wird das Medium durch frisches ersetzt. Jeweils 250 µl serumfreies Medium werden mit 6 µl Reagenz bzw. 20 nM siRNA versetzt, die Mischung mit siRNA wird zu der Mischung mit dem Transfektionsreagenz gegeben, gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran werden 500 µl des gebildeten Komplexes zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Kulturschale vermischt. Nach 4 – 8 h sollte das Medium erneut ausgetauscht werden. Um den optimalen Zeitpunkt für Versuchsdurchführung zu eruieren, wird nach Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, 168 h und 192 h die Effizienz der Herunterregulierung auf mRNA Ebene durch quantitative RT-PCR und auf Proteinebene durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender *Western Blot* Analyse ermittelt.

### 3.2.3 Arbeiten mit DNA

#### 3.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR ermöglicht die Herstellung millionenfacher Kopien von Nukleotidsequenzen begrenzter Größe. Hierzu wird ein Überschuss an kurzen Oligonukleotiden (sog. *Primer*) benötigt, die jeweils sequenzspezifisch an einen Bereich am 5' - Ende der DNA-Matrizenstränge hybridisieren (was als *annealing* bezeichnet wird) und das zu amplifizierende Stück einschließen.

Zunächst muss Denaturierung erfolgen, d. h., die Matrizen-DNA muss durch Erhitzen einzelsträngig gemacht werden, dann kann die hitzestabile Taq-Polymerase vom 3' - Ende der Oligonukleotide aus den neuen Strang synthetisieren. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet. Der neu entstandene DSB muss abermals durch Erhitzen denaturiert werden, so dass sich erneut Oligonukleotide an die DNA (Matrizen oder Amplifikate) anlagern können. Da dieser Prozess zyklisch wiederholt wird, kann die DNA exponentiell vermehrt werden.

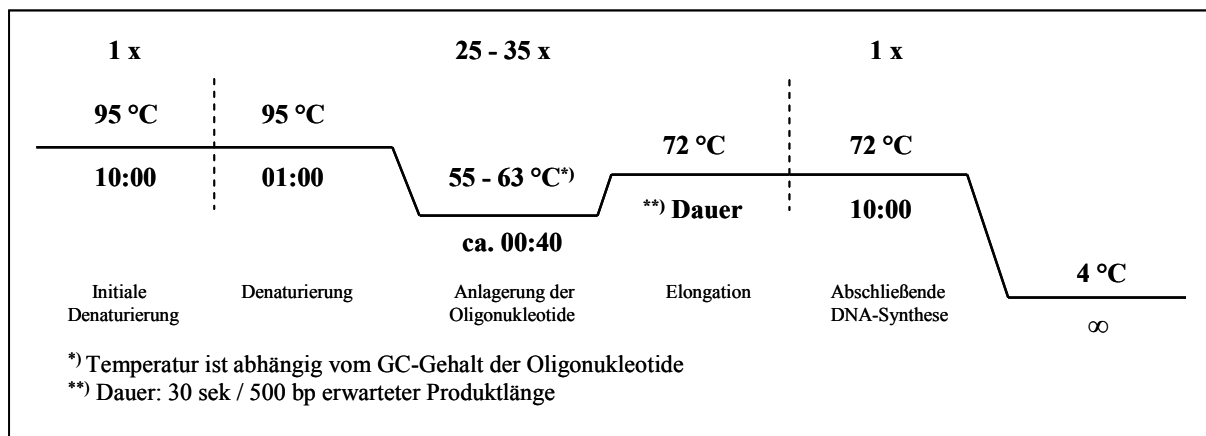


Abbildung 9: Grundschema für eine PCR.

\*) Die Anlagerungstemperatur  $T_A$  berechnet sich nach der Wallace-Regel:

$$T_A = (m \cdot 2^\circ\text{C} + n \cdot 4^\circ\text{C}) - 5^\circ\text{C} \text{ mit}$$

$$m = \text{Anzahl (T + A) und}$$

$$n = \text{Anzahl (C + G)}$$

Zu 0,1 µl - 1 µl der Matrizen-DNA wird 1/10 Endvolumen 10 x PCR-Puffer, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP-Mischung, je 0,5 mM des 3' - und 5' - Oligonukleotids und 1 U *Taq-Polymerase* pipettiert und mit Wasser auf das benötigte Endvolumen aufgefüllt.

Die Durchführung der Reaktion erfolgt nach dem in Abbildung 9 beschriebenen Grundschema im *Thermocycler*.

### 3.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der DNA anhand ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist abhängig von der Konzentration des Agarosegels und der Fragmentgröße (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Agarosegelkonzentration und Auftrennungsvermögen.**

(Sambrook *et al.*, 1989).

Agarose [%]	Auftrennungsvermögen [bp]
0,5	700 bp - 25 kb
0,8	500 bp - 15 kb
1,0	250 bp - 12 kb
1,2	150 bp - 6 kb
1,5	80 bp - 4 kb

Die für die jeweilige Konzentration benötigte Menge Agarose wird in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur kann sie auch für einige Tage bis zur Verwendung flüssig gehalten werden. Die Agarosemischung wird in eine entsprechende Apparatur gegossen, um sie abzukühlen und damit polymerisieren zu lassen. Nach Überschichtung mit 1 x TBE als Laufpuffer können die mit 1 / 6 Vol 6 x Auftragspuffer versetzten Proben, sowie ein Längenstandard mit Fragmenten bekannter Länge, aufgetragen werden. Der Gellauf erfolgt bei einer Spannung von etwa 12 V / cm Gellänge für ca. 1h. Zur Visualisierung der DNA-Banden wird das Gel im Anschluss für 10 - 15 min in einer Ethidiumbromid-Puffer-Lösung inkubiert. Die Aufnahme und Auswertung erfolgt mittels Anregung durch UV-Licht und dem Programm zur Geldokumentation.

### 3.2.4 Alkalischer *Comet Assay*

Die Einzelzell-Gelelektrophorese, auch *Comet Assay* genannt, beruht auf der Messung von DNA-Strangbrüchen in einzelnen kernhaltigen Zellen. Aus DNA-Strangbrüchen resultierende DNA-Fragmente werden bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung als Kometenschweife erfasst. Im alkalischen *Comet Assay* wird durch das Entwinden der DNA in alkalischem Puffer gleichzeitig die Reparatur von SSB und DSB erfasst (Protokoll modifiziert nach Singh *et al.*, 1988).

Vor Beginn des Versuchs werden zunächst die mit 70% Ethanol gereinigten Objektträger mit 0,1% Agarose mit Hilfe eines Kunststoffspatels beschichtet.

Die Lymphozyten der Probanden werden 24 h vor Bestrahlung in Kultur genommen. Unmittelbar vor Bestrahlung werden pro Proband jeweils zwölf Aliquots mit  $5 \times 10^4$  Lymphozyten in 10  $\mu$ l isotoner NaCl-Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt. Dies entspricht einem Doppelansatz und ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Pipettierschema für den *Comet Assay*.**

Dosis / Reparaturzeit	0 min	15 min	60 min
0 Gy	2 Aliquots	2 Aliquots	2 Aliquots
4 Gy	2 Aliquots	2 Aliquots	2 Aliquots

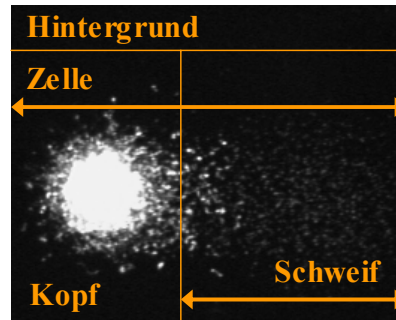
Die Proben werden auf Eis mit Hilfe der HWM-D 2000 mit einer Dosis von 4 Gy bestrahlt. Im Anschluss daran erfolgt für jeweils 0 min, 15 min und 60 min Reparatur der induzierten Schäden im Heizblock bei 37 °C. Nach der Inkubation werden die Aliquots in jeweils 100  $\mu$ l 0,5% Agarose aufgenommen, auf einen Objektträger pipettiert und mit einem mit Triton-X-Lösung vorbehandelten Deckglas abgedeckt. Zum Aushärten werden die Objektträger für ca. 5 min auf eine mit Eis gekühlte Kälteplatte gelegt. Sobald die Agarose ausgehärtet ist, werden die Deckgläser entfernt. Die Objektträger werden zur Zelllyse für eine Stunde bei 4 °C in Lysepuffer I inkubiert, gefolgt von einer Stunde Inkubation in Lysepuffer II bei 37 °C zur Entfernung der Detergenzien. Danach werden die Objektträger zur DNA-Entwindung für 20 min in Elektrophorese-Puffer equilibriert. Die anschließende Elektrophorese erfolgt für 30 min bei 24 V in einer mit Eis gekühlten Elektrophoresekammer. Zur Neutralisation werden die Objektträger im Anschluss in einer Küvette mit 1 M Ammoniumacetat in EtOH für 30 min inkubiert und danach über Nacht bei Raumtemperatur in 100% EtOH dehydriert. Bevor die Objektträger getrocknet werden, erfolgt eine Inkubation in 70% EtOH für 5 min. Die getrockneten Objektträger können bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert werden.

Vor der Färbung müssen die Objektträger für mindestens 15 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  rehydriert werden, danach werden sofort 50  $\mu$ l Färbelösung je Objektträger aufpipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Gefärbte Objektträger können, sofern sie nicht sofort ausgewertet werden, bis zu 7 Tage in einer feuchten Kammer bei 4 °C aufbewahrt werden.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit einer Anregung von 465 nm und durch die Software Viscomet von TILL Photonics.

Die kometenähnlich geformten Zellen im *Comet Assay* lassen sich in die Kompartimente „Kopf“ und „Schweif“ unterteilen. Gemessen werden unter anderem für jede Zelle die Länge

der Zelle („*Comet Extent*“), des Schweifs („*Tail Extent*“) sowie des Kopfes („*Head Extent*“), die Intensität der gesamten Zelle („*Comet total intensity*“, Summe aller Pixelintensitäten des Graustufenbildes), die Fläche der Zelle („*Comet total area*“, Anzahl der Pixel im Binärbild) und der Anteil an DNA im Kopf und im Schweif (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Definition der Maße im Comet Assay.**

Der „Komet“ im *Comet Assay* gliedert sich in „Kopf“ und „Schweif“. Gemessen werden können unter Anderem die Länge der Gesamtzelle, die Schweiflänge, und Länge des Kopfes.

Aus den gemessenen Werten werden der *Tail extent moment* sowie der *Olive Tail Moment* berechnet. Der *Tail extent Moment* (TEM) wird aus dem Produkt aus DNA-Gehalt im Schweif [%] und Schweiflänge berechnet:

$$M_{T\ ext} = L \times \frac{DNA}{100}$$

mit  $L$  = Länge des Schweifs,  $DNA$  = Anteil DNA im Schweif in %.

Der *Olive Tail Moment* (TOM), eine Weiterführung des TEM, berechnet sich als das Produkt aus dem Abstand der Hauptintensitäten von Kopf und Schweif und dem DNA-Gehalt im Schweif:

$$M_{T\ Olive} = (|CG - CG_{Head}|) \times \frac{DNA}{100}$$

mit  $CG$  = Hauptintensität im Schweif,  $CG_{Head}$  = Hauptintensität im Kopf,  $DNA$  = Anteil DNA im Schweif in %.

Mit Hilfe des TOM sowie des relativen DNA-Gehalts im Schweif können Zellen als geschädigt bzw. repariert klassifiziert werden.

### 3.2.5 Arbeiten mit RNA und cDNA

#### 3.2.5.1 RNA-Isolation mit RNeasy

Um RNA aus Zellen zu isolieren, kann der *RNeasy Kit* verwendet werden. Die Zellen werden hierfür nach der Ernte mit 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol versetzt. Nach Durchmischung dieser Suspension werden die Zellen durch mechanisches Scheren lysiert. Dies erfolgt durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Zellsuspension durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm. Das so erhaltene Lysat wird mit gleichem Volumenanteil 70% Ethanol versetzt und gemischt. 700 µl dieser Mischung werden auf eine RNA-Säule gegeben und für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Die RNA sollte nun an die Säule gebunden vorliegen, der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wird einmal mit Puffer RW1 und zweimal mit Puffer RPE gewaschen und im Anschluss trocken zentrifugiert, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Danach wird das Eluat mit 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gewonnen und kann bei -80 °C gelagert werden.

Die Konzentration der RNA kann im Photometer bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt werden, da das Absorptionsmaximum von RNA bei dieser Wellenlänge liegt. Eine Absorption bei 260 nm von 1,0 entspricht einer Konzentration von 40 µg / ml. Durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, kann die Reinheit der RNA bestimmt werden.

#### 3.2.5.2 cDNA-Synthese mittels RT-PCR

Mit Hilfe der *Superscript II RNase H - Reverse Transcriptase* (daher RT-PCR) kann mRNA in cDNA übersetzt werden. Hierfür werden dT-Oligonukleotide verwendet, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und als *Primer* fungieren.

Der Reaktionsansatz enthält bis zu 1 µg isolierter Gesamt-RNA in einem Volumen von maximal 10 µl. Diese RNA wird zusammen mit 1 µl der Oligonukleotide und 1 µl einer 10 mM dNTP-Mischung mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht. Um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wird der Reaktionsansatz für 5 min auf 65 °C erhitzt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Im Folgenden werden 4 µl 5 x *FirstStrand Buffer*, 3 µl 0,1 M DTT und 1 µl *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* zugegeben und gut gemischt. Nach Inkubation bei 42 °C für 2 min, um den dT-Oligonukleotiden Zeit zu geben, sich an den polyA-Schwanz der mRNA anzulagern, wird 1 µl *Superscript II RT* zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 42 °C für 50 min,



um die Transkription zu ermöglichen. Ein Erhitzen auf 70 °C für 15 min führt zu Inaktivierung der reversen Transkriptase.

Die entstandene cDNA kann mittels PCR weiter amplifiziert oder im *Light Cycler* quantifiziert werden.

### **3.2.5.3 Quantitative *real-time-PCR* im *LightCycler***

Eine besondere Form der PCR, die *real-time-PCR*, ermöglicht den quantitativen Nachweis des mRNA-Gehalts in Zellen. Bei dieser PCR wird die *Faststart*-Taq-DNA-Polymerase verwendet, die aufgrund von hitzelabilen Modifikationsgruppen bei RT inaktiv ist. Die Reaktion wird erst durch Erhitzen auf 95 °C gestartet, so kann ein genaueres Ergebnis erzielt werden, da keine verfrühte unspezifische Elongation möglich ist.

Zum Nachweis der DNA wird der DNA-Doppelstrang - spezifische Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green 1* verwendet, der spezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Durch diese Bindung steigert sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs um das Hundertfache. Bei der Amplifikation entstehende Produkte können so durch ihre Fluoreszenz detektiert werden.

Um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu Amplifikationsprodukten führen, sollten die Oligonukleotide exonübergreifend gewählt werden. Die während der Amplifikation mit steigender Zykluszahl zunehmende Fluoreszenz wird im *LightCycler* für jeden Zyklus gemessen und als Kurve dargestellt (daher *real-time-PCR*). Aus diesen Kurven wird durch das Programm der *crossing point* (Cp) ermittelt, der angibt, wie viele Zyklen nötig sind, um eine definierte Menge eines Produkts zu erzeugen.

Zunächst sollte eine Kalibrierkurve erstellt werden, um die Effizienz der *real-time-PCR* zu bestimmen. Dazu wird folgende Reihe von Verdünnungen aus PCR-Produkten einer vorhergehenden PCR hergestellt:  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$ . Wird der Logarithmus der relativen Konzentration gegen die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um den Cp zu erreichen, aufgetragen, resultiert eine Kalibrierungskurve. Mit Hilfe der Steigung  $m$  der Kalibrierungskurve lässt sich die Effizienz berechnen:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

Um die Ausgangskonzentration der Probe bestimmen zu können, wird eine relative Quantifizierung durchgeführt. Dies geschieht mit Hilfe der Expression eines nicht regulierten Haushaltsgens (*house keeping gene*, HKG). Bei dem verwendeten Gen handelt es sich um B2M (Beta-2-Mikroglobulin). Die Expression des Zielgens kann dann mit der Expression dieses Haushaltsgens verglichen werden. Dazu wird zunächst folgende Gleichung verwendet:

$$K = T_0 \cdot (E)^{C_p}$$

Hierbei steht K für die Menge an PCR-Produkt, die bei Erreichen des  $C_p$  vorhanden ist,  $T_0$  steht für die Ausgangskonzentration der Probe.  $C_p$  steht für die Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um eine bestimmte Menge an DNA zu erhalten. Diese Menge an PCR-Produkt am  $C_p$  ist für alle Proben gleich. Nimmt man an, dass  $T_0$  für das Haushaltsgen gleich 100% sei (Normierung), kann man zur Berechnung der relativen Kopienzahl des PCR-Produkts des Zielgens folgende Formel heranziehen:

$$T_{0 \text{ Zielgen}} = 100 \cdot \frac{(E_{\text{Haushaltsgen}})^{C_p \text{ Haushaltsgen}}}{(E_{\text{Zielgen}})^{C_p \text{ Zielgen}}}$$

Als Matrize zur Durchführung der RT-PCR dient cDNA. Eingesetzt wird 1 µl einer 1:10 Verdünnung sowie 1 µl Roche-Mix, 0,8 µl 25 mM  $MgCl_2$ , 2 µl einer Lösung, die eine Konzentration von 2,5 mM beider Oligonukleotide aufweist, und 3,2 µl Wasser. Die Reaktion erfolgt in speziellen Kapillaren, in die die Ansätze überführt, danach abzentrifugiert und in den *Light Cycler* gegeben werden.

Die Reaktion läuft nach dem in Abbildung 11 beschriebenen Schema ab.

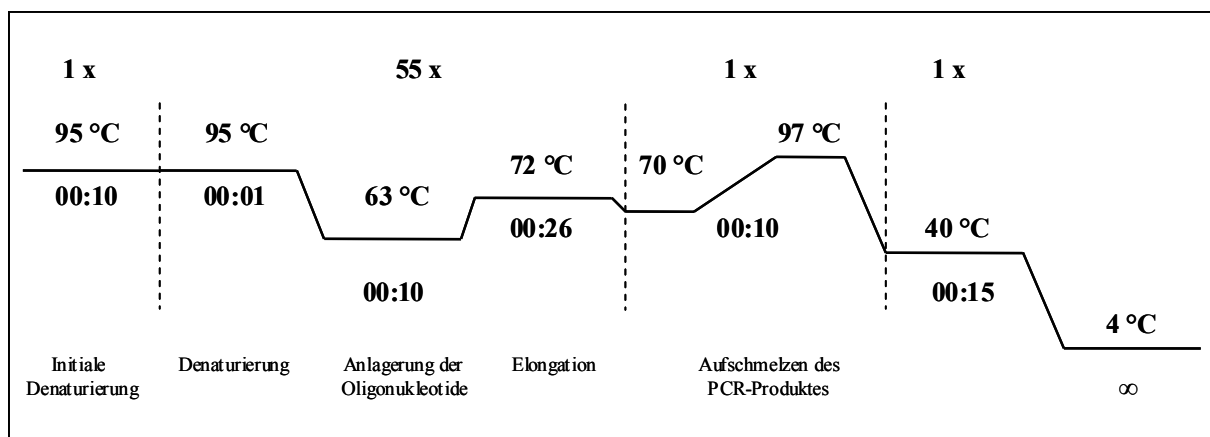


Abbildung 11: Grundschemata für eine *real-time-PCR*.

### **3.2.6 Proteinchemische Methoden**

#### **3.2.6.1 Proteinisolation aus Säugerzellen**

Zur Isolation des Gesamtzellproteins werden die Zellen zunächst geerntet. Das Zellsediment wird mit kaltem PBS gewaschen und in 30 - 100 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor PMSF und Phosphataseinhibitor NOV (jeweils 10 µM) aufgenommen und zur Zellyse für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 x g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

#### **3.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Methode nach Bradford ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zelllysate. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des im Bradford-Reagenz vorliegenden Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 (CBBG), mit Proteinen einen Komplex zu bilden, indem es an Arginin und aromatische Reste bindet. Im Zuge dieser Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Mit Hilfe eines Photometers kann man aus der Absorption bei 595 nm somit auf die vorhandene Proteinmenge schließen.

Zunächst wird mit einem geeigneten Protein, z. B. BSA, eine Kalibrierungskurve erstellt. Hierfür werden aus einer BSA-Stammlösung der Konzentration 1 µg / µl verschiedene Volumina entsprechend verschiedener Mengen an Protein (0 µg als Leerwert, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg) entnommen und in Kunststoffküvetten zur Messung im Photometer überführt. Die Ansätze werden mit jeweils 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Für die Zelllysate mit unbekannter Proteinkonzentration werden in jeweils dreifachem Ansatz Verdünnungen mit dem Faktor 1 : 500 bzw. 1 : 1000 in 1 ml Bradford-Reagenz hergestellt. Nach Inkubation für 5 - 30 min bei RT im Dunklen kann die Absorption bei 595 nm im Photometer bestimmt werden. Unter Einberechnung der Verdünnung kann mit Hilfe der Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

#### **3.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli können Proteinextrakte nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteine im Zelllysate werden hierfür mit SDS denaturiert, um gleiche negative Ladung für alle Proteine zu erhalten. Zusätzlich befindet sich im Auftragspuffer Mercaptoethanol, um Disulfidbrücken zu lösen.

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese basiert darauf, dass ein weitporiges Sammelgel über ein engporiges Trenngel geschichtet wird. Dadurch können schärfere Banden erzielt und ein Aggregieren der Proteine verhindert werden.

**Tabelle 3: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Acrylamid / BisAA und Auftrennungsvermögen von SDS-Gelen.** (nach Maniatis *et al.*).

AA / BisAA 20% / 1% [%]	Auftrennungsvermögen [kDa]
5	57 - 212
7,5	36 - 94
10	16 - 68
15	12 - 43

Die Konzentration von Acrylamid / Bisacrylamid (20% / 1%) im Trenngel richtet sich dabei nach der Größe des aufzutrennenden Proteins (Tabelle 3), während die Konzentration im Sammelgel immer gleich bleibt. Zunächst wird in die gründlich gereinigte Gelapparatur das Trenngel, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4 für verschiedene Konzentrationen aufgetragen ist, mit der entsprechenden Konzentration für das Zielprotein eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um einen glatten Übergang zwischen Trenngel und Sammelgel zu erhalten.

**Tabelle 4: Rezepturen für SDS-Polyacrylamid-Gele verschiedener Konzentration.**

Trenngele	5,0%	8,0%	10,0%	12,0%	14,0%	15,0%	16,0%	Sammelgel (5%)	
AA / BisAA 20% / %	0,83	1,35	1,65	2	2,35	2,5	2,65	0,3	ml
H <sub>2</sub> O	2,2	1,7	1,4	1,05	0,7	0,55	0,4	1,4	ml
1 M Tris pH 8,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	0,25 (pH 6,8)	ml
10% SDS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02	ml
10% AMPS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02	ml
TEMED	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,002	ml

Nach Polymerisierung des Trenngels (mindestens 30 min, besser ÜN in feuchte Tücher eingeschlagen bei 4 °C) kann das Isopropanol entfernt, das Sammelgel eingefüllt und mit dem Probenauftragskamm abgeschlossen werden. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist (ca. 30 - 45 min) wird der Kamm entfernt, das Gel in die Gelkammer eingespannt und diese mit 1 x Laemmli Laufpuffer gefüllt. Während das Gel polymerisiert, werden die Proben zum Auftrag auf das Gel vorbereitet. Hierfür wird dem Proteinextrakt 1 / 4 Volumenteil 4 x Laemmli-Puffer zugegeben und für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren.

Im Anschluss werden die Proben sowie ein Standardmarker, der Proteine mit bestimmtem Gewicht enthält, auf das Gel aufgetragen. Als Standardmarker wird der *Precision Plus Protein Dual Color Standard* verwendet. Der Gellauf erfolgt für 1 - 2 h (bis die Lauffront, die durch Bromphenolblau im Auftragspuffer sichtbar gemacht wird, das Ende des Gels erreicht hat) bei 25 mA pro angeschlossenem Gel und maximaler Spannung.

#### **3.2.6.4 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose**

Durch das Verfahren des *Western Blot* (nach Towbin *et al.*, 1979) können Proteine, die in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt vorliegen, zur Detektion und Identifizierung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Der Transfer der Proteine erfolgt durch *Semi-Dry Elektroblothing*.

Das SDS-Trenngel wird hierfür für ca. 20 min in Towbin-Puffer equilibriert, das *Blotting*-Papier (extra dickes Filterpapier) und die Nitrozellulosemembran werden in Towbin-Puffer getränkt. Auf die Anode werden von unten nach oben ein Bogen *Blotting*-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Trenngel und ein weiterer Bogen *Blotting*-Papier gelegt. Der Transfer erfolgt für ca. 45 - 60 min bei einer Spannung von 10 V in der *Blotting*-Apparatur. Durch Färbung mit PonceauRotS Färbelösung für 3 - 5 min und anschließende Teilentfärbung mit H<sub>2</sub>O werden die Proteine unspezifisch auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht.

#### **3.2.6.5 Immundetektion von Proteinen**

Die transferierten Proteine können spezifisch durch Antikörperdetektion auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Der primäre Antikörper (Ak) erkennt spezifisch sein Epitop im Protein. Ein sekundärer Ak, der mit der Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) konjugiert ist, erkennt wiederum die konstante Domäne des primären Ak. Mit Hilfe der HRP kann der gebundene Ak dann detektiert werden.

Zunächst werden unspezifische Ak-Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt, indem die Membran für 45 - 60 min in Blockpuffer geschüttelt wird, zusätzlich wird in diesem Schritt die PonceauRotS Färbelösung wieder entfernt. Die Membran wird mit 1 x TBS-T gespült, um den Blockpuffer zu entfernen, danach kann der primäre Ak zugegeben werden. Dieser wird vor Gebrauch gemäß den mitgelieferten Anweisungen bis zu einer Konzentration von 2 - 3 µg / ml in 1 x Roti® Block verdünnt, es erfolgt eine Inkubation unter Schütteln bei 4 °C ÜN. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 1 x TBS-T, um ungebundenen Ak zu entfernen, erfolgt die Detektion des ersten mit dem zweiten Ak. Dieser Ak wird ebenfalls

anweisungsgemäß in Blockpuffer verdünnt und unter Schütteln für 45 - 60 min inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen der Membran mit 1 x TBS-T für je 10 min und kurzem Spülen mit PBS. Mit Hilfe der an den sekundären Ak gekoppelten HRP können nun die Proteinbanden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme des *ECL Advanced Western Blotting Detection Kit*. Die Membran wird mit einer Mischung der in dem Kit enthaltenen Lösungen *Lumigen™ TMA-6 Solution A* (Luminol) und *Lumigen™ TMA-6 Solution B* (Wasserstoffperoxid) im Verhältnis 1:1 überschichtet. Nach Inkubation von 1 - 10 min (je nach Bedarf) wird die Flüssigkeit vollständig entfernt, die Membran in eine Folie überführt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wird je nach Signalstärke für 10 sek bis 1 h exponiert und entwickelt.

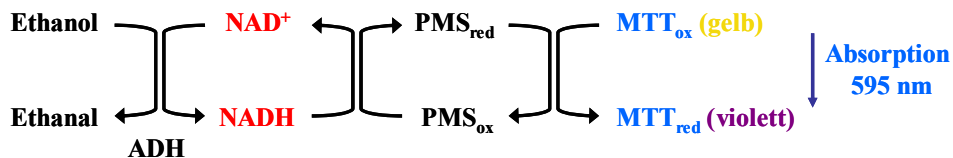
### **3.2.6.6 Entfernen von Antikörpern**

Da häufig verschiedene Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden sollen, müssen die gebundenen primären und sekundären Ak auf dieser wieder entfernt werden, um eine neue Immundetektion durchführen zu können. Dafür wird die mit Ak dekorierte Membran für 15 min bei RT mit ca. 20 ml *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x TBS-T und erneutem Blocken mit Blockpuffer kann die Membran erneut mit einem primären Ak behandelt werden.

### **3.2.7 Kolorimetrische Bestimmung zur Quantifizierung des NAD<sup>+</sup>-Gehalts**

Der kolorimetrische Nachweis zur Quantifizierung des NAD<sup>+</sup>-Gehalts basiert auf einer Reihe von Oxidations- und Reduktionsvorgängen, die zyklisch miteinander verbunden sind (*enzyme cycling assay*). Er ermöglicht indirekt eine Untersuchung der Aktivität von Parp1 (Poly(ADP)ribose-Polymerase 1) und damit auch der Aktivität von Xrcc1 (*X-ray repair cross complementing 1*) im Zuge der Reparatur von Basenschäden. Werden Zellen z. B. mit einem Agens wie Methylmethansulfonat (MMS), mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder durch Bestrahlung behandelt, können Einzelstrangbrüche (SSB, *single strand breaks*) der DNA auftreten. Eines der ersten Proteine, die zur Schadensstelle rekrutiert werden, ist Parp1. Da Parp1 die Poly(ADP)ribosylierung katalysiert und die Poly(ADP)ribose (PAR) Synthese unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup> stattfindet, führen vermehrte Basenschäden so zu einer Verarmung an NAD<sup>+</sup> in einer Zelle. Nach erfolgter Poly(ADP)ribosylierung werden weitere Reparaturproteine, darunter auch Xrcc1, an die Schadensstelle rekrutiert. Die Bestimmung des NAD<sup>+</sup>-Gehalts erfolgt über den bereits erwähnten *enzyme cycling assay* (Abbildung 12).

Die Alkoholdehydrogenase (ADH) setzt hierbei unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  Ethanol zu Ethanal um. Mit Hilfe der Reduktion von N-Methylphenazoniummethylsulfat (PMS) in ursprünglich oxidiertem Zustand kann das entstandene NADH wieder zu  $\text{NAD}^+$  regeneriert werden. Durch die Reduktion von 3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) kann das reduzierte PMS wieder in den oxidierten Zustand versetzt werden und steht für weitere Reaktionszyklen zur Verfügung. In diesem letzten Reduktionsschritt wird oxidiertes, gelb gefärbtes MTT in reduziertes, violett gefärbtes MTT umgewandelt. Diesen Farbwechsel kann man idealerweise bei der Wellenlänge 595 nm messen. Da das vorhandene Photometer jedoch nur 570 nm, nicht aber 595 nm erfassen kann und eine Messung bei 570 nm möglich ist, wird die Menge an violetter MTT bei 570 nm im Photometer gemessen. Daraus können Rückschlüsse auf die Menge an  $\text{NAD}^+$  im Zelllysats gezogen werden.



**Abbildung 12: Enzyme cycling assay zur Quantifizierung des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts.**

Durch die Aktivität der ADH wird Ethanol zu Ethanal unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  umgesetzt. Das dabei gebildete NADH wird durch Reduktion von PMS wieder zu  $\text{NAD}^+$  regeneriert. Oxidiertes MTT kann nun das reduzierte PMS wieder oxidieren. Dieser letzte Schritt führt zu einem Farbumschlag von gelbem oxidiertem MTT nach violetter reduziertem MTT, das man im Photometer bei der Wellenlänge 595 nm quantifizieren kann. Da der Farbumschlag auch bei der Wellenlänge 570 nm gemessen werden kann und das vorhandene Photometer eine Messung bei 595 nm nicht unterstützt, werden die Messungen bei 570 nm durchgeführt.

Dieser Versuch wird an LCL von Spendern durchgeführt, die Träger des Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) *XRCC1* Arg280His sind. Die Zellen werden nach Behandlung wie unter Kapitel 3.2.1.2 beschrieben geerntet. Jeweils eine Probe bleibt als Kontrolle unbehandelt. Das Zellsediment wird gründlich in 500  $\mu\text{l}$  100 mM Kaliumphosphat TCA-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation für 5 min bei 12000 x g und 4 °C. Der Überstand wird abgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 100  $\mu\text{l}$  Kaliumhydroxid-Tris-Puffer überführt. 200  $\mu\text{l}$  des so neutralisierten Zelllysats werden in ein Reaktionsgefäß mit 900  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix pipettiert, mit 100  $\mu\text{l}$  ADH versetzt und gemischt, um die Reaktion zu starten. Nach Inkubation von 10 – 30 min bei 30 °C im Dunklen und anschließendem Abkühlen kann die Absorption des Reaktionansatzes bei 570 nm im Photometer gegen eine Leerprobe (*blank*), die kein Zelllysats enthält, gemessen werden.

### 3.2.8 Durchflusszytometrische Methoden

#### 3.2.8.1 Annexin V-Assay zur Quantifizierung der induzierten Apoptose in Lymphozyten

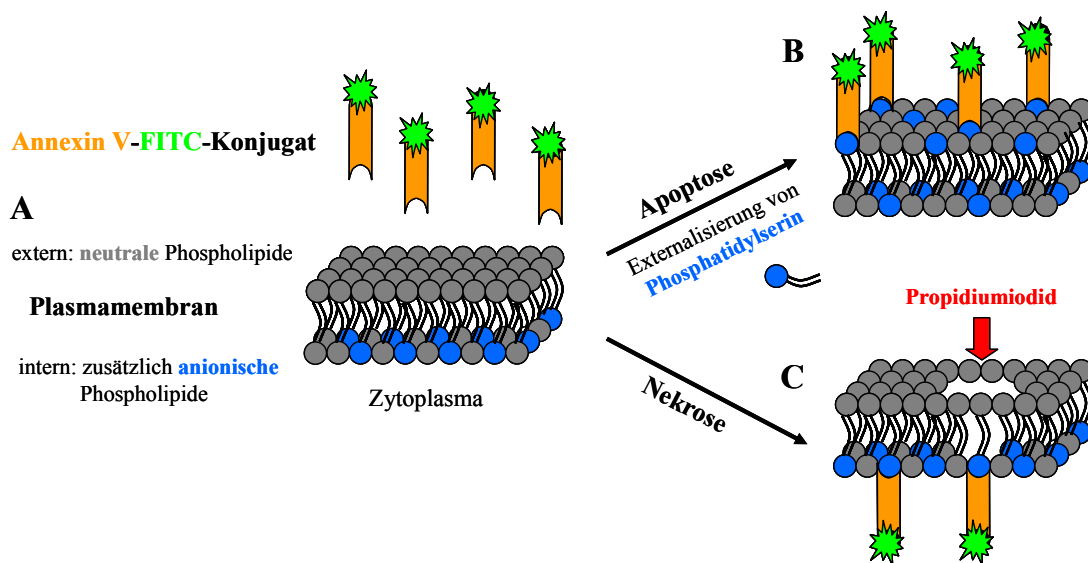
Der durchflusszytometrische Annexin V-Assay wird an Lymphozyten beider Kollektive sowie Lymphozyten einer gesunden Kontrollperson durchgeführt, die *in vitro* mit 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy in einer  $\gamma$ -Strahlenquelle bestrahlt werden.

Im Folgenden werden die Lymphozyten mit einer Antikörperlösung gegen CD3 und CD19 und danach mit Annexin V und Propidiumiodid behandelt. Die Behandlung mit Annexin V basiert darauf, dass Annexin V eine starke Affinität zu anionischen Phospholipiden und speziell zu Phosphatidylserin zeigt. Eine gesunde Zelle zeigt auf der Außenseite ihrer Plasmamembran neutrale Phospholipide, auf der Innenseite aber zusätzliche anionische Phospholipide (Abbildung 13A). Wird sie geschädigt und geht in Apoptose, werden anionische Phospholipide, unter ihnen Phosphatidylserin, externalisiert (Abbildung 13B). Diese können von Annexin V erkannt werden. Da die Membran trotz der Externalisierung intakt bleibt, kann das zugegebene Propidiumiodid nicht in die Zelle eindringen, sie ist also im Versuch Annexin V-positiv und PI-negativ. Wird eine Zelle so sehr geschädigt, dass Nekrose auftritt, wird die Zellmembran geschädigt und weist Löcher auf (Abbildung 13C). Durch diese können sowohl Annexin V als auch PI in die Zelle eindringen, sie ist im Versuch für Annexin V und PI positiv. So können lebende, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden und quantitativ ausgewertet werden (Vermes *et al.*, 1995).

24 h vor der Bestrahlung werden die Lymphozyten der Probanden in Kultur genommen und unmittelbar vor Bestrahlung in jeweils drei Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm überführt. Der Ansatz sieht Bestrahlung mit 0,4 Gy und 0,8 Gy sowie eine unbestrahlte Kontrolle vor. Die Proben werden nach Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> geerntet und mit PBS gewaschen. Die folgenden Schritte müssen zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe im Dunklen vorgenommen werden. Es erfolgt eine Inkubation der Proben in jeweils 25  $\mu$ l Antikörperlösung, die Antikörper gegen humanes CD3 zur Erkennung von T-Lymphozyten und gegen humanes CD19, um B-Lymphozyten zu markieren, enthält. Die beiden Antikörper sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin konjugiert. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Proben für 15 min bei RT mit Annexin V-Lösung inkubiert und können nach Zugabe von 400  $\mu$ l *binding buffer for apoptosis assays* bei 4 °C unter Lichtschutz für einige Stunden bis zur Messung aufbewahrt werden.



Die Messung erfolgt mit einem BD LSR II Durchflusszytometer und der Software FACSDiva von Becton Dickinson.



**Abbildung 13: Markierung der Zellen im Annexin V-Assay.**

(Modifiziert nach [www.bdbiosciences.ca](http://www.bdbiosciences.ca)).

**A:** Die Plasmamembran einer gesunden Zelle zeigt auf der Außenseite neutrale Phospholipide, auf der Innenseite zusätzlich anionische Phospholipide.

**B:** Wird eine Zelle, z. B. durch ionisierende Strahlung, geschädigt und geht in Apoptose, werden anionische Phospholipide, unter ihnen Phosphatidylserin, externalisiert. Diese können von mit FITC konjugiertem Annexin V, das eine starke Affinität zu anionischen Phospholipiden im Allgemeinen und zu Phosphatidylserin im Speziellen zeigt, erkannt werden. Da die Membran intakt ist, kann kein PI eindringen.

**C:** Wird eine Zelle so sehr geschädigt, dass Nekrose auftritt, können durch die nun löcherige Membran sowohl Annexin V als auch PI eindringen.

Der Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin emittiert bei einer Wellenlänge von 660 nm, FITC wird mit einem Bandpassfilter für Wellenlängen um 530 nm aufgenommen, Propidiumiodid kann bei der Wellenlänge 610 nm gemessen werden. Die Anregungswellenlänge ist 488 nm. Nekrotische Zellen sind Annexin V- / PI-positiv, apoptotische Zellen sind Annexin V-positiv, aber PI-negativ, gesunde Zellen sind für beide Farbmarker negativ.

### 3.2.8.2 Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1)

Da der Annexin V-Assay sich für lymphoblastoide Zelllinien als problematisch herausgestellt hat, wird mit der Messung der hypodiploiden Zellfraktion ein weiterer durchflusszytometrischer Test zur quantitativen Untersuchung von Apoptose verwendet. Für diesen Test wird zunächst die Membran der untersuchten Zellen permeabilisiert, um Eindringen von Propidiumiodid in den Zellkern zu ermöglichen. Dies führt zu Anfärbung der DNA. Durch die Färbung und anschließende Messung im Durchflusszytometer kann der DNA-Gehalt der Zellen festgestellt werden. In einer gesunden Zellpopulation gibt es einen

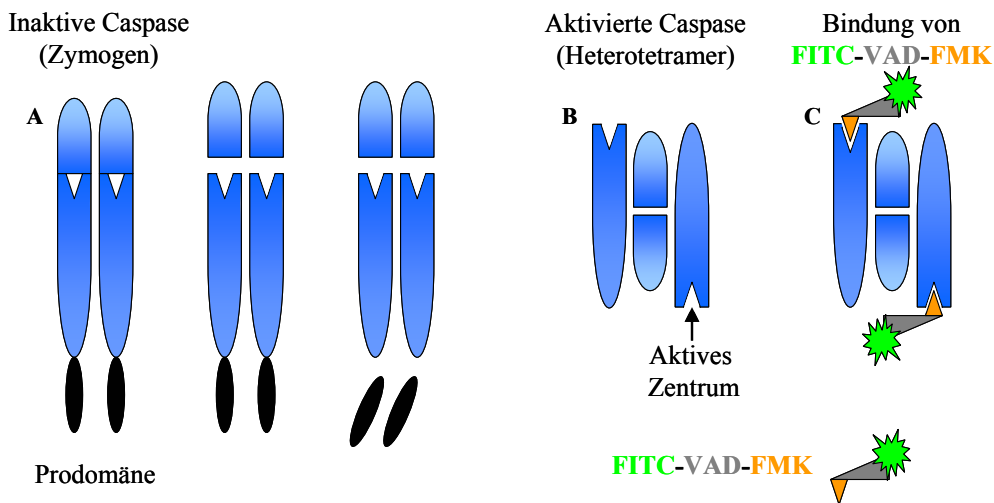
relativ großen Anteil an Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, des Weiteren einen kleineren Anteil an Zellen, die sich in der G2-Phase befinden und deshalb im Vergleich zu den in der G1-Phase befindlichen Zellen doppelten DNA-Gehalt aufweisen und entsprechend doppelt so starke Fluoreszenz zeigen. Im Bereich dazwischen befinden sich Zellen in der S-Phase. In geschädigten Zellpopulationen, die z. B. bestrahlt wurden, findet man eine weitere Zellpopulation, deren DNA-Gehalt geringer ist als in Zellen der G1-Phase. In diesem Fall spricht man von hypodiploiden Zellen oder Sub G1. Dies basiert darauf, dass im Zuge der Apoptose eine Degradierung der DNA und ein Verlust der degradierten DNA erfolgen. Ein Nachteil dieser Testmethode gegenüber dem Annexin V-*Assay* besteht darin, dass nekrotische Zellen nicht von apoptotischen unterschieden werden können und somit nicht eindeutig Apoptose nachgewiesen werden kann.

Die wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben in Kultur gehaltenen Zellen werden vor Bestrahlung zunächst in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium ausgesät, dann jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy bzw. mit 0 Gy als Kontrolle geerntet und mit PBS gewaschen. Eventuell ist (je nach Zellwachstum) für die späteren Zeitwerte die Zugabe von Medium nach 24 h bzw. 48 h sinnvoll, dies wird bei Bedarf durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgt eine Inkubation mit Lösung I für 30 bis 60 min gefolgt von Zugabe von gleichem Volumen Lösung II. Die Proben können bis zur Messung maximal zwei Wochen bei 4 °C im Dunklen aufbewahrt werden. Die rote Fluoreszenz wird mit einem Langpassfilter für Wellenlängen >600 nm detektiert und auf einer linearen Skala quantifiziert. Durch Analyse der Spannungsabfallkurve am Fluoreszenzdetektor werden Zelldoubletten, die die Auswertung stören, nicht miterfasst. Alle Zellen, die eine geringere Fluoreszenz als Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus hatten, werden als apoptotisch klassifiziert. Die Anregungswellenlänge ist 488 nm. Um eine bessere Auftrennung der Populationen zu gewährleisten, sollte die Messung nach Möglichkeit im langsamen Aufnahmemodus durchgeführt werden.

### **3.2.8.3 Detektion von Caspasen durch einen fluorochrommarkierten Caspase-inhibitor**

Eine weitere Methode, Apoptose in Zellen nachzuweisen, besteht in der Detektion von aktiven Caspasen, da Caspasen spezifisch während der Apoptose aktiviert werden. Eine Möglichkeit, aktive Caspasen indirekt nachzuweisen, besteht in der Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Caspaseinhibitors. Der Caspaseinhibitor VAD-FMK kann z. B. mit

FITC konjugiert werden (FITC-VAD-FMK) (Smolewski, 2002). Eine schematische Darstellung der Funktionsweise von FITC-VAD-FMK ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Caspaseinhibitors FITC-VAD-FMK.** (Nach Smolewski, 2002).

**A:** Die inaktive Caspase wird aktiviert.

**B:** Die aktivierte Caspase bildet einen Tetramers.

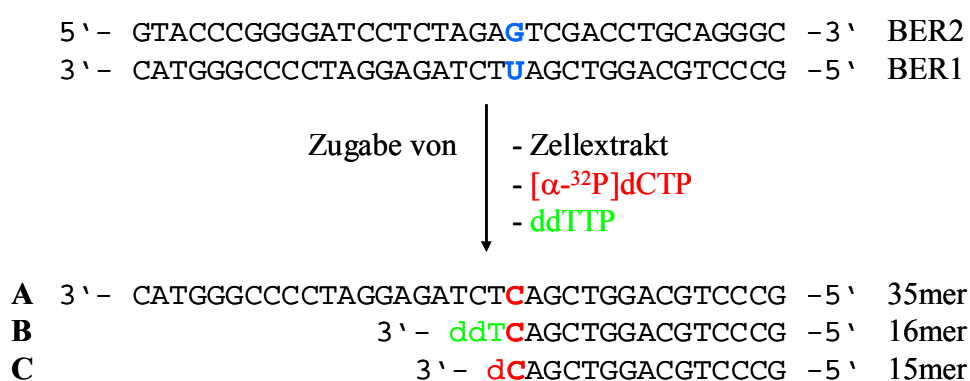
**C:** Ein mit FITC markierter Caspaseinhibitors bindet an das enzymatische Zentrum der Caspase.

Da die Membranen permeabel sind für dieses Konstrukt, kann es in nicht fixierte Zellen eindringen und dort an das aktive Zentrum der Caspasen binden. Je mehr aktive Caspasen vorhanden sind, desto mehr Inhibitor-konstrukt kann binden. Die Fluoreszenzaktivität markierter Zellen kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Die vor Bestrahlung zunächst in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium ausgesäten Zellen werden jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy bzw. mit 0 Gy (Kontrolle) geerntet, auch hier ist eventuell (je nach Zellwachstum) für die späteren Zeitwerte die Zugabe von Medium nach 24 h bzw. 48 h sinnvoll, das Sediment wird sofort in 70 µl der Caspaseinhibitor-Lösung aufgenommen und für 20 min im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS erfolgt Zentrifugation für 5 min bei 300 x g, RT. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 400 µl PBS aufgenommen. Die so behandelten Proben sollten zeitnah gemessen werden und bis zur Messung bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt werden. Die Analyse wird im Durchflusszytometer bei der Wellenlänge 530 nm durchgeführt.

### 3.2.9 Vergleichende Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur in Zellextrakten

Die Basenexzisionsreparatur (BER) beruht im Wesentlichen auf zwei alternativen Reparaturwegen. Bei dem so genannten *short patch*-Reparaturweg wird an der Einzelstrang-Schadensstelle ein einziges Nukleotid ausgeschnitten und ersetzt, der *long patch*-Reparaturweg führt zur Neusynthese eines kurzen Strangabschnitts von zwei oder mehr Nukleotiden. Aufgrund dieser Tatsache können die verschiedenen BER-Wege anhand der vergleichenden Quantifizierung ihrer Reparaturprodukte untersucht werden.



**Abbildung 15: Funktionsweise der vergleichenden Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur in Zellextrakten.**

Der Reaktionsansatz enthält das dsDNA-Oligomer BER1 / BER2. Durch Zugabe von Zellextrakt, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP und ddTTP unter Bedingungen, die Reparatur ermöglichen, wird die Reparatur des fehlgepaarten Uracil durch die im Zellextrakt vorhandenen Proteine provoziert. Die Produkte der Reparatur sind

**A:** bei *short patch*-Reparatur ein radioaktiv markiertes Oligomer von 35 nt Länge.

**B:** bei *long patch*-Reparatur ein radioaktiv markiertes Oligomer von 16 nt Länge.

**C:** bei nicht abgeschlossenen Reparaturvorgängen ein radioaktiv markiertes Oligomer von 15 nt Länge.

Den Zellextrakten wird hierbei zur Reparatur ein dsDNA-Oligonukleotid von 35 nt Länge mit einem Basenaustausch von Cytosin nach Uracil an der Stelle bei 21 nt (BER1 / BER2) zugegeben. Des Weiteren enthält der Reaktionsansatz ddTTP und [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP. Werden nun Bedingungen hergestellt, die DNA-Reparatur ermöglichen, wird sowohl im *short patch*-Reparaturweg als auch im *long patch*-Reparaturweg in das Oligonukleotid BER1 an Stelle des Uracil ein [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP eingebaut. Durch vorzeitiges Beenden der Reparatur des Schadens an dieser Stelle mittels Zugabe von EDTA und Erhitzen erhält man ein radioaktiv markiertes Oligomer von 15 nt Länge als Produkt. Es kann nicht unterschieden werden, ob der *short patch*-Reparaturweg oder der *long patch*-Reparaturweg stattgefunden hat. Wird das Reparaturereignis komplett vollzogen, erhält man für den jeweiligen Reparaturweg typische Produkte. Im Fall des *short patch*-Reparaturweges wird das fehlgepaarte Uracil

ausgeschnitten, ein [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP eingebaut und der verbleibende SSB ligiert. Es resultiert ein radioaktiv markiertes Oligomer mit 35 nt Länge (Abbildung 15A). Bei dem *long patch*-Reparaturweg beginnt nach Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP die Neusynthese eines kurzen Strangabschnittes. Da das folgende Nukleotid Thymin ist und im Reaktionsansatz ausschließlich ddTTP vorliegt, kann der Strang nicht weiter elongiert werden, es resultiert ein radioaktiv markiertes Oligomer mit 16 nt (Abbildung 15B). Diese Mischung aus Oligomeren von unterschiedlicher Länge kann mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Exposition eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden.

Um nun eine Aussage über die relative Menge des jeweiligen Reparaturproduktes treffen zu können, werden die zu untersuchenden Proben jeweils mit einer Kontrolle aufgetragen. Dieser Versuch wird an LCL von Spendern durchgeführt, die homozygote Träger des seltenen Allels des SNP *XRCC1* Arg280His sind. Die Kontrolle ist hierbei die LCL SiMö, die homozygot das häufige Allel des SNP aufweist. Des Weiteren wird der Versuch auch an hTERT-RPE-Zellen, die mit *XRCC1* siRNA transfiziert und für drei Tage bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert werden, durchgeführt. Als Kontrolle dienen entsprechend hTERT-RPE-Zellen, die mit siNeg behandelt werden. Durch eine Zeitreihe kann sowohl der Beginn eines Reparaturereignisses als auch die Menge an Reparaturprodukt der jeweiligen Kontrolle mit einer Probe verglichen werden.

#### **3.2.9.1 Annealing der DNA-Oligonukleotide**

Bevor die Oligonukleotide BER1 und BER2 verwendet werden können, müssen die komplementären Stränge angelagert werden, um einen DNA-Doppelstrang von 35 Nukleotiden mit einem eingebauten Uracil an Stelle eines Thymins zu erhalten. Zu diesem Zweck werden gleiche Volumina von BER1 und BER2, die in gleicher Konzentration vorliegen, gemischt und mit 1 / 10 Volumen PCR-Puffer versetzt. Es erfolgt Erhitzen für 10 min auf 95 °C gefolgt von langsamem Abkühlen.

#### **3.2.9.2 Vorbereitung der Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA**

Da die Sephadex G-25 Füllung der Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA vorgequollen in einem STE-Puffer vorliegt, müssen die Säulen vor Verwendung getrocknet werden. Dazu werden gemäß der Packungsbeilage zunächst die Deckel an Ober- und Unterseite gelöst und die Säule in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit einem 1,5 ml Auffanggefäß platziert. Durch zweimalige Zentrifugation für 4 min bei 1100 x g mit jeweils anschließendem

Verwerfen des Überstandes kann der Puffer vollständig entfernt werden. Die Säulen werden nun in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit einem neuen 1,5 ml Auffanggefäß überführt und können so verwendet werden.

### **3.2.9.3 Markierung der Standardoligonukleotide für die Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur**

Die Markierung der Standardoligonukleotide, die als Größenmarker bei der Gelelektrophorese eingesetzt werden, erfolgt in drei Ansätzen (für das 15mer, das 16mer und das 35mer) mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK). Dieses Enzym ist eine Polynukleotid-5'-hydroxylkinase und katalysiert den Transfer eines Phosphats von ATP auf die 5' - OH -Gruppe der Oligonukleotide. Durch die Verwendung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  wird eine radioaktive Markierung der Oligonukleotide erreicht.

Die Reaktionsansätze setzen sich aus 0,1 nM gelöstem Oligonukleotid, 1 / 10 Volumenteil des 10 x Reaktionspuffer A, 2 nM ATP, 10 U T4 PNK und 10 mCi / ml  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  zusammen und werden jeweils mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach Inkubation bei 37 °C für 20 min werden die Ansätze für 10 min auf 75 °C erhitzt und mit Hilfe von Sephadex G-25 Säulen aufgereinigt.

### **3.2.9.4 Herstellung von Zellextrakten**

Nach Ernte und zweimaligem Waschen der Zellen in PBS (300 x g, 5 min) wird das Sediment in Puffer I (BER-*Assay*) aufgenommen, ein gleicher Volumenteil an Puffer II (BER-*Assay*) wird zugegeben. Eine Inkubation für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler schließt sich an, gefolgt von Zentrifugation bei 16000 x g, 4 °C für 30 min. Der Überstand wird abgenommen, und, falls er nicht sofort verwendet wird, in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren. In diesem Zustand kann er bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

### **3.2.9.5 Nachweis von Produkten der Basenexzisionsreparatur**

Jeweils 1  $\mu\text{g}$  Protein eines (mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf das gewünschte Volumen verdünnten) Zellextraktes wird mit einem entsprechenden Volumen 5 x BER-Puffer versetzt, um 1 x BER-Puffer im endgültigen Volumen des Ansatzes zu erhalten. Dazu werden 250 nM der DNA-Oligonukleotid-Mischung pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2,2  $\mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  und Inkubation bei 37 °C wird die Reparatur gestartet. Die Reaktion wird in einer Zeitreihe nach jeweils 0 min, 2 min, 5 min, 10 min,

15 min und 20 min durch Zugabe von 50 mM EDTA und Erhitzen auf 72 °C für 5 min terminiert. Bei Bedarf können zusätzliche Zeitpunkte eingeführt oder gestrichen werden. Da das Gel eine begrenzte Anzahl an Bahnen zum Probenaufrag aufweist und mit jeweils sechs Zeitpunkten pro Probe in einem Versuch nur eine Probe mit der Kontrolle verglichen werden kann, werden in späteren Versuchen nur noch die Zeitwerte 0 min, 5 min, 10 min und 20 min berücksichtigt, um einen Vergleich von zwei Proben mit einer Kontrolle zu erreichen. Das Volumen jeder Probe wird nun mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 50 µl aufgefüllt, um sie in vorbereitete Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA auftragen zu können. Die Säulen werden mit den Proben für 4 min bei 1100 x g zentrifugiert. Das aufgereinigte Produkt liegt nun im 1,5 ml Auffanggefäß vor und wird mit gleichem Volumen DNA-Auftragspuffer für den Nachweis von BER-Produkten versetzt, die Säule kann verworfen werden. Nach Erhitzen auf 72 °C für 2 min können die Proben zusammen mit einem Marker, der zu gleichen Anteilen markierte Oligonukleotide von 15 nt, 16 nt und 35 nt Länge aufweist, auf ein denaturierendes 18% PAA Gel von 35 cm Länge aufgetragen werden.

Um eine bessere Auftrennung zu gewährleisten, sollte das Gel zunächst einen Vorlauf für 30 min bei 600 V, 25 mA, 100 W durchlaufen, bevor die Proben aufgetragen werden. Die Auftrennung der Proben erfolgt dann für 3,5 h bei 600 V, 25 mA, 100 W.

Um die markierten Oligonukleotide sichtbar zu machen, wird das Gel luftdicht in eine Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Dieser wird je nach Stärke des Signals für 3 h bis mehrere Tage exponiert und entwickelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur DNA-Reparatur

#### 4.1.1 Vergleich von primären Lymphozyten eines Patienten- und eines Kontroll-Kollektivs im alkalischen *Comet Assay*

Mit Hilfe der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese, auch alkalischer *Comet Assay* genannt, kann die DNA-Bruchreparatur nach ionisierender Bestrahlung zwischen verschiedenen Proben-Kollektiven verglichen werden (Cornetta *et al.*, 2006). Durch 1 Gy ionisierende Strahlung werden in der DNA etwa 2000 - 3000 Basenschäden, 1000 DNA-SSB und lediglich 40 DNA-DSB induziert (Sak *et al.*, 2005). Aufgrund des alkalischen Schritts zur Entwindung der DNA konnte der alkalische *Comet Assay* in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSB, *single strand break*) herangezogen werden. Das Prinzip des *Comet Assay* besteht darin, dass DNA-Fragmente aus dem Zellkern im elektrischen Feld einer Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die größeren Fragmente verbleiben hierbei innerhalb des Kerns, der als „Kopf“ des „Kometen“ bezeichnet wird, während die kleineren Fragmente als „Schweif“ eine charakteristische Form bilden, der der *Comet Assay* seinen Namen verdankt.

Der alkalische *Comet Assay* wurde für primäre Lymphozyten der Proben aus dem KORA-Kollektiv und der LUCY-Kohorte durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden für jeden gewünschten Messpunkt und für jede Probe, sofern möglich, auf jeweils zwei Objektträgern 50 Zellen zur Auswertung herangezogen. In jedem Einzelexperiment, das zwei bis vier Proben beinhaltet, wurde zusätzlich eine interne Laborkontrolle, die als SM bezeichnet wird, mitgeführt. Bei dieser Kontrolle handelte es sich um primäre Lymphozyten einer gesunden weiblichen Spenderperson, die nach demselben Protokoll gewonnen wurden wie die Proben.

Die *Software* Viscomet von TILL Photonics ermöglichte die Erfassung mehrerer Parameter, darunter die Dimensionen des „Kometen“, des Kopfes und des Schweifs, den relativen DNA-Gehalt von Kopf und Schweif und daraus abgeleitete Werte wie den *Tail Moment* (TM) und den *Olive Tail Moment* (TOM), der im Rahmen dieser Arbeit zur Auswertung herangezogen wurde. Die gesamte statistische Auswertung des *Comet Assay* erfolgte mit der Hilfe von H. Braselmann aus der Arbeitsgruppe Zytogenetik des Instituts für Molekulare Strahlenbiologie des Helmholtz Zentrums München.



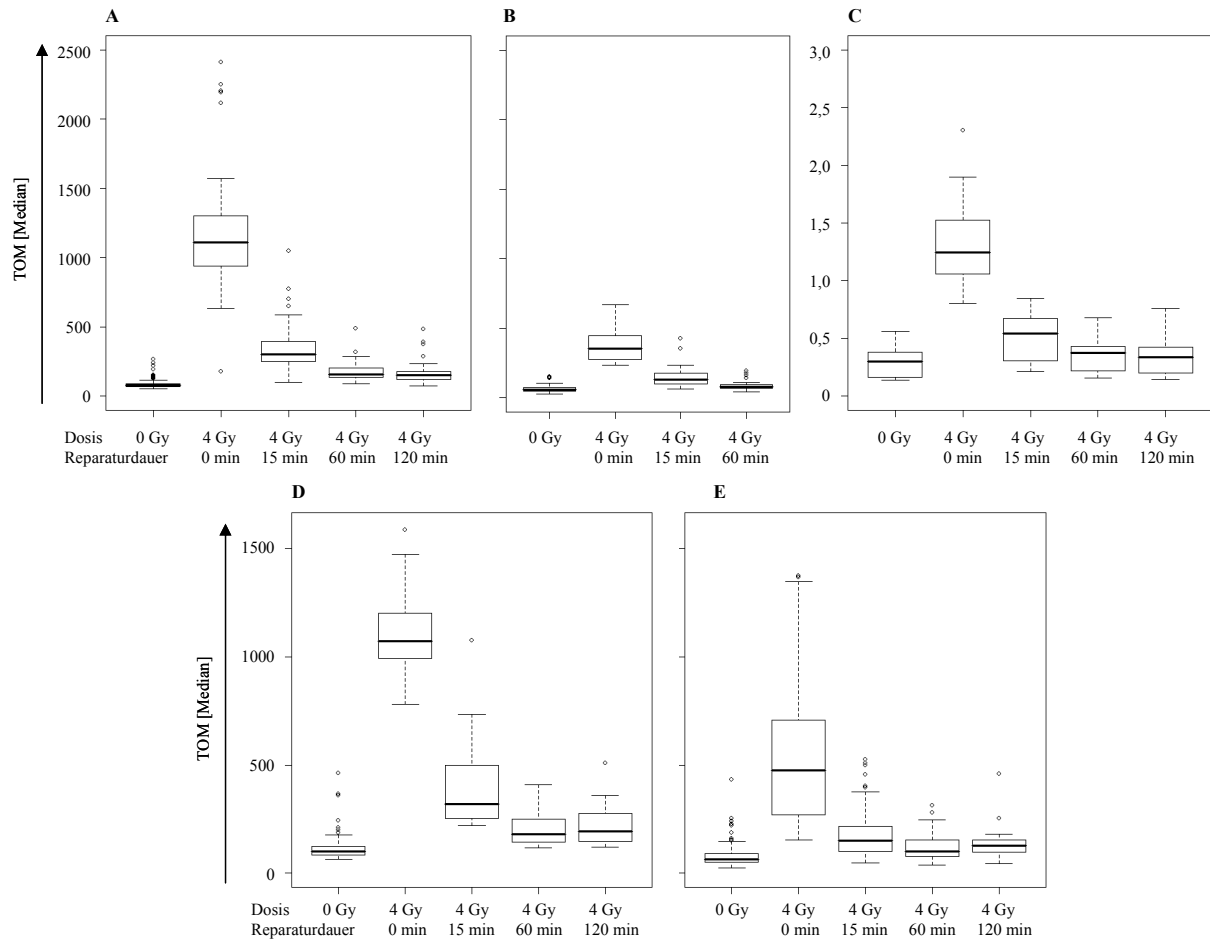
#### **4.1.1.1 Ermittlung von Korrelationen zwischen Auswertungsgruppen und ermittelten Werten im *Comet Assay***

Die Erfassung der Daten erfolgte für die Proben des KORA-Kollektivs unterteilt in drei Gruppen, im Folgenden KORA 1 mit 54 Proben, KORA 2 mit 29 Proben und KORA 3 mit 43 Proben genannt. Insgesamt ergab dies Werte für 126 Proben inklusive einiger Doppelbestimmungen. Für die Proben der LUCY-Kohorte erfolgte die Erfassung der Daten in zwei Gruppen, im Folgenden als LUCY 1 mit 16 Proben und LUCY 2 mit 87 Proben bezeichnet. Auch in diesen insgesamt 103 Einzelexperimenten sind Doppelbestimmungen einzelner Proben enthalten. Die Datenerhebung für die Proben KORA 1 und LUCY 1 erfolgte in Auswertungsgruppe 1 unter Verwendung von 73 Kontrollproben, die Erfassung für die Proben KORA 2 und LUCY 2 in Auswertungsgruppe 2 unter Verwendung von 50 Proben der Kontrolle. Die Probengruppe KORA 3 wurde von Auswertungsgruppe 3 unter Verwendung eines anderen Auswertungssystems untersucht, hier wurden 15 Kontrollen eingesetzt. Die Auswertungsgruppen entstanden durch personelle Wechsel in der Durchführung und der Auswertung der Versuche. Da eine leichte Korrelation zwischen der Auswertungsgruppe und den erhaltenen Werten auftrat, musste überprüft werden, ob ein Einfluss auf die statistische Auswertung besteht. Dies geschieht zum einen mit Hilfe der Medianwerte des TOM, zum anderen unter zu Hilfenahme der Medianwerte des DNA-Gehalts im Schweif in Prozent.

#### **4.1.1.2 Ermittlung von Korrelationen zwischen Auswertungsgruppen und ermittelten Werten im *Comet Assay* unter Verwendung des TOM**

Zunächst wurden einige der im *Comet Assay* gewonnenen Parameter durch Vorab-Berechnungen auf ihre Eignung für die statistische Analyse überprüft. Als geeignet wurden Parameter angesehen, die übereinstimmend einen Anstieg des DNA-Schadens nach Bestrahlung sowie einen Rückgang des Schadens nach erfolgter Reparatur zeigten. Wie auch in vielen Publikationen (Trzeciak *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 2007; Cornetta *et al.*, 2006; Møller, 2006) wurden der TOM (siehe Kapitel 3.2.4), zu dessen Berechnung mehrere Parameter des „Kometen“ herangezogen werden, und der DNA-Gehalt im Schweif ausgewählt.

In Abbildung 16 ist die Medianverteilung der ermittelten Werte des TOM der Ergebnisse für die KORA-Proben und die Proben des LUCY-Kollektivs in den jeweiligen Auswertungsgruppen dargestellt.



**Abbildung 16: Boxplots für die Medianverteilung des TOM in den einzelnen Auswertungsgruppen der Proben des KORA-Kollektivs sowie der LUCY-Kohorte.**

Gezeigt werden jeweils der Median als breite Linie, die *Box* als Rechteck mit schmaler Linie, die *Whisker* als gestrichelte Linie und einzelne Ausreißer als Kreise. In jeder Darstellung sind die Werte in der Reihenfolge unbestrahlte Kontrolle, unmittelbar nach Bestrahlung, 15 min nach Bestrahlung und 60 min nach Bestrahlung aufgetragen.

**A:** KORA-Gruppe 1

**B:** KORA-Gruppe 2

**C:** KORA-Gruppe 3 (mit abweichendem Auswertesystem, weshalb hier eine abweichende Skalierung der Ordinate vorliegt)

**D:** LUCY-Gruppe 1

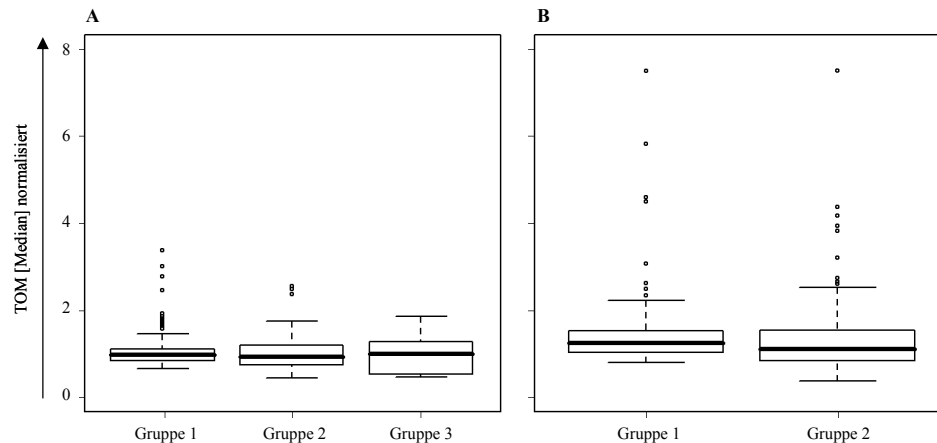
**E:** LUCY-Gruppe 2

Für jede der Gruppen konnte ein Anstieg der Medianwerte des TOM unmittelbar nach Bestrahlung sowie ein Rückgang nach erfolgter Reparatur von 15 min und 60 min festgestellt werden. Die unmittelbar nach Bestrahlung ermittelten Werte für KORA-Gruppe 1 zeigten mit dem 14,2 -fachen Wert der unbestrahlten Kontrolle den höchsten relativen Dosisseffekt, gefolgt von KORA-Gruppe 2 mit den 6,2 -fachen und KORA-Gruppe 3 mit dem 4,1 -fachen Wert der unbestrahlten Kontrolle. Der aus den Werten unmittelbar nach Bestrahlung durch Bezug auf die Werte der unbestrahlten Probe ermittelte Dosisseffekt lag für LUCY-Gruppe 1 bei dem 10,7 -fachen Wert, für LUCY-Gruppe 2 bei dem 7,1 -fachen Wert der unbestrahlten Proben.

In den Diagrammen sind jeweils die Medianwerte für die unbestrahlten Kontrollen, für die Proben unmittelbar nach Bestrahlung sowie nach einer Reparaturzeit von 15 min und 60 min als *Boxplots* aufgetragen. Ein *Boxplot* ist ein Diagramm, durch das Maße der Tendenz, Streuung und Schiefe einer Reihe numerischer Daten zusammengefasst werden können. Als

*Box* wird das durch die 25%- und 75%-Quantile bestimmte Rechteck bezeichnet, das somit 50% der Daten umfasst. Die breite Linie innerhalb der Box kennzeichnet den Median der Werte. Durch die Länge der Box ist die Interquantilbreite definiert. Die Länge der so genannten *Whisker*, die im Diagramm durch die gestrichelte Linie markiert sind, definiert sich als maximal die 1,5 -fache Interquantilbreite, wird jedoch immer durch den größten bzw. den kleinsten Wert der Daten, der noch innerhalb dieser Grenzen liegt, bestimmt. Werte, die außerhalb dieser Grenzen liegen, werden als Ausreißer bezeichnet und sind in Abbildung 16 durch Kreise dargestellt.

Für jede der Gruppen konnte ein Anstieg der gemessenen Werte und folglich des DNA-Schadens unmittelbar nach Bestrahlung mit 4 Gy festgestellt werden. Erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C für 15 min, konnte ein Rückgang des Schadens und somit Reparatur verzeichnet werden, die sich bei einer Inkubationsdauer von 60 min fortsetzte. Nach Inkubation bei 37 °C und somit Reparaturdauer von 120 min konnte in den KORA-Gruppen 1 und 3 sowie den LUCY-Auswertungsgruppen kein weiterer Rückgang des Schadens erkannt werden. In KORA-Gruppe 2 liegen keine Werte für diesen Zeitpunkt vor. Der Dosiseffekt konnte nun als Verhältnis der Werte unmittelbar nach Bestrahlung zu den Werten der unbestrahlten Proben berechnet werden. Der Dosiseffekt lag in KORA-Gruppe 1 bei dem 14,2 -fachen Wert des Medians der unbestrahlten Probe, in Gruppe 2 bei dem 6,2 -fachen Wert und in Gruppe 3 nur bei dem 4,1 -fachen Wert. Für die LUCY-Gruppe 1 ergab sich ein Dosiseffekt von dem 10,7 -fachen Wert des Medians der unbestrahlten Kontrolle, in Gruppe 2 von dem 7,1 -fachen Wert. Um die unterschiedlichen Anfangsverteilungen in den einzelnen Gruppen ermitteln und vergleichen zu können, wurde eine Gruppennormalisierung der jeweiligen Werte der unbestrahlten Proben auf den Median der unbestrahlten Proben des KORA-Kollektivs der jeweiligen Auswertungsgruppe durchgeführt (Abbildung 17). Eine Normalisierung von Werten verschiedener Proben-Kollektiven muss, sofern möglich, immer auf die Ergebnisse eines Kollektivs gesunder Kontrollpersonen durchgeführt werden, da bereits in früheren Studien festgestellt werden konnte, dass Lymphozyten von Krebspatienten einen höheren spontanen Initialschaden aufwiesen als Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen (Shahidi *et al.*, 2007). Die Normalisierung war in diesem Fall nötig, da die Auswertung mit verschiedenen Auswertesystemen zu unterschiedlichen Größenordnungen der Ergebnisse führte. Nach der Normalisierung lagen die Mediane der unbestrahlten Proben des KORA-Kollektivs bei eins, für das LUCY-Kollektiv lagen sie in Gruppe 1 um den Faktor 1,3 höher, in Gruppe 2 um den Faktor 1,2.



**Abbildung 17: Darstellung der einer Gruppennormalisierung unterzogenen Medianwerte des TOM der einzelnen Gruppen für die unbestrahlten Proben zum Zeitpunkt 0.**

Die Normalisierung der Gruppen erfolgte auf den Median der unbestrahlten Proben des KORA-Kollektivs.

**A:** Normalisierte Werte für die KORA-Gruppen.

Die Werte der unbestrahlten Proben in Gruppe 1 zeigten eine spitzere und länger gezogene Verteilung der normalisierten TOM-Werte als Gruppe 2 und 3.

**B:** Normalisierte Werte für die LUCY-Gruppen.

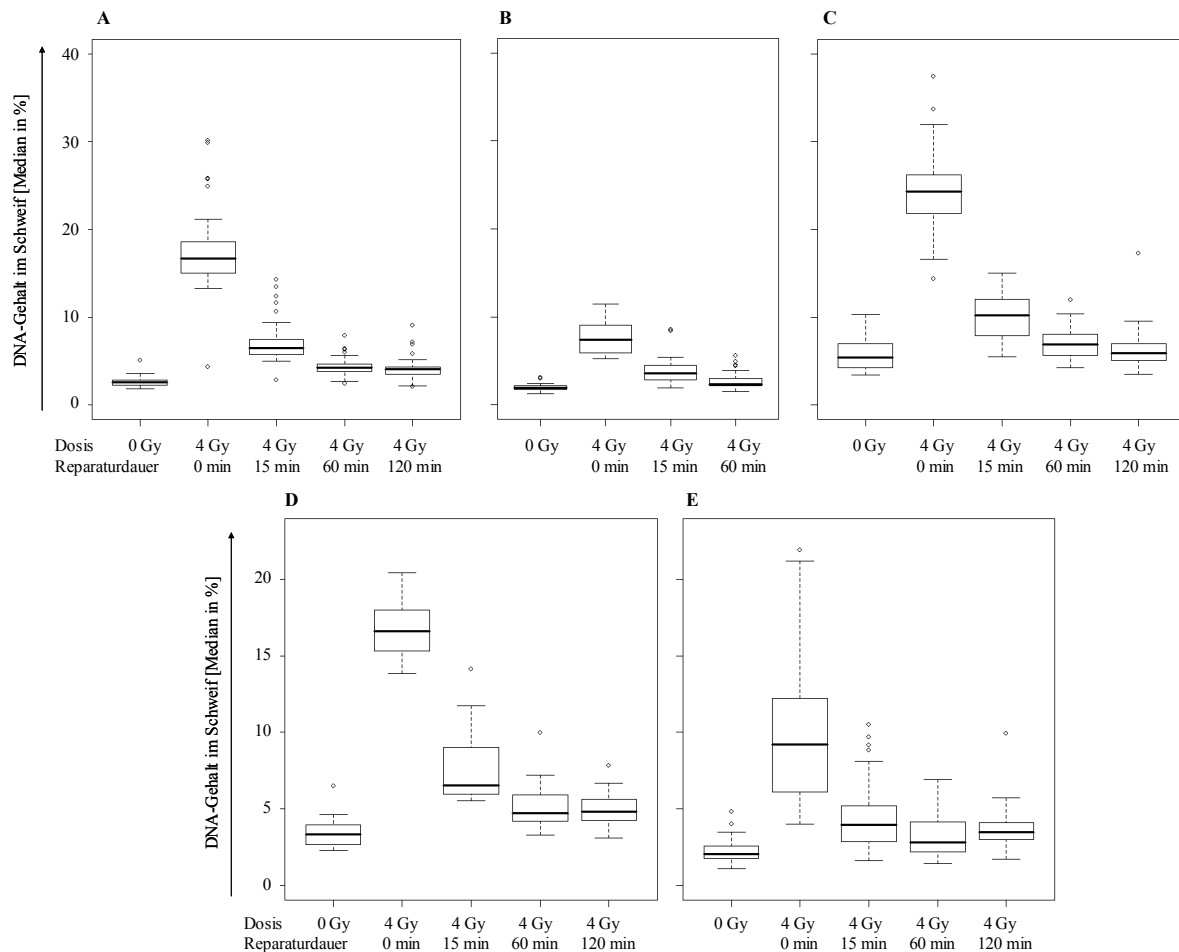
Für die Werte der unbestrahlten Proben konnte festgestellt werden, dass der normalisierte Median geringfügig höher liegt als 1, der Hintergrundschaden war also etwas größer als in den KORA-Proben, die Streuung etwas höher. In Gruppe 2 lag eine deutlich größere Streuung vor als in Gruppe 1.

Die Verteilung der Werte der unbestrahlten Proben in KORA-Gruppe 1 war im Vergleich zu Gruppe 2 und 3 relativ spitz und lang gezogen, der höchste Wert lag bei dem 3,5 -fachen Wert des Medians. Für beide LUCY-Auswertegruppen war die Streuung etwas breiter als in der zugehörigen KORA-Gruppe, der höchste Wert lag in Gruppe 1 bei dem 6 -fachen, in Gruppe 2 etwa bei dem 5 -fachen Wert des Medians mit einem Ausreißer bei dem 7,5 -fachen Wert.

#### **4.1.1.3 Ermittlung von Korrelationen zwischen Auswertungsgruppen und ermittelten Werten im Comet Assay unter Verwendung des DNA-Gehalts im Schweif**

Ein weiterer häufig verwendeter Parameter, der für die statistische Auswertung des *Comet Assays* herangezogen wird, ist der relative DNA-Gehalt im Schweif in Prozent (Saha *et al.*, 2008; Cornetta *et al.*, 2006). Um die mit Hilfe des TOM gewonnenen Ergebnisse abzusichern, erfolgte eine zusätzliche Analyse des DNA-Gehalts im Schweif. Zudem ist ein Vorteil dieses Parameters, dass er unabhängig vom verwendeten Auswertungssystem ist.

Die Medianverteilung der ermittelten Werte des DNA-Gehalts im Schweif für die KORA-Proben und die Proben des LUCY-Kollektivs in den jeweiligen Auswertungsgruppen ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Boxplots für die Medianverteilung des relativen DNA-Gehalts im Schweiß in den einzelnen Auswertungsgruppen der Proben des KORA-Kollektivs sowie der LUCY-Kohorte.**

Gezeigt werden jeweils der Median als breite Linie, die *Box* als Rechteck mit schmaler Linie, die *Whisker* als gestrichelte Linie und einzelne Ausreißer als Kreise. In jeder Darstellung sind die Werte in der Reihenfolge unbestrahlte Kontrolle, unmittelbar nach Bestrahlung, 15 min nach Bestrahlung und 60 min nach Bestrahlung aufgetragen.

**A:** KORA-Gruppe 1

**B:** KORA-Gruppe 2

**C:** KORA-Gruppe 3

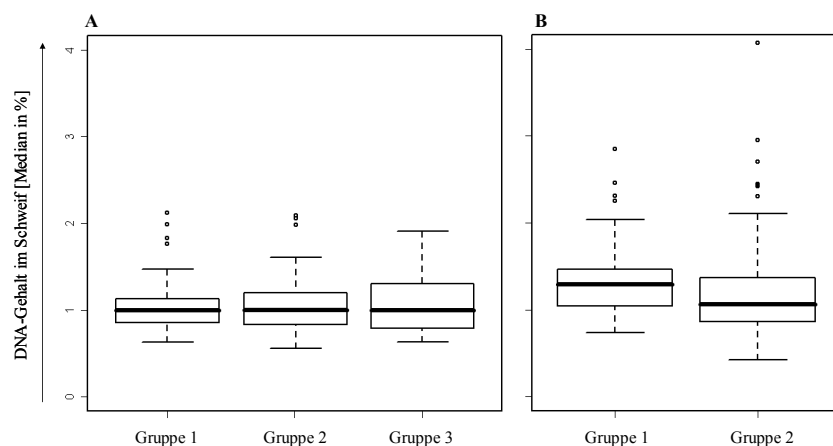
**D:** LUCY-Gruppe 1

**E:** LUCY-Gruppe 2

Analog zur Auswertung mit Hilfe des TOM konnte für jede der Gruppen ein Anstieg der Medianwerte des DNA-Gehalts im Schweiß unmittelbar nach Bestrahlung, sowie ein Rückgang nach erfolgter Reparatur von 15 min und 60 min festgestellt werden. Die unmittelbar nach Bestrahlung ermittelten Werte für KORA-Gruppe 1 zeigten mit dem 6,3 -fachen Wert der unbestrahlten Kontrolle den höchsten relativen Dosisereffekt, gefolgt von KORA-Gruppe 3 mit den 4,5 -fachen und KORA-Gruppe 2 mit dem 3,8 -fachen Wert der unbestrahlten Kontrolle. Der aus den Werten unmittelbar nach Bestrahlung durch Bezug auf die Werte der unbestrahlten Probe ermittelte Dosisereffekt lag für LUCY-Gruppe 1 bei dem 5,0 -fachen Wert, für LUCY-Gruppe 2 bei dem 4,4 -fachen Wert der unbestrahlten Proben. Insgesamt zeigen die Werte der unterschiedlichen Auswertungsgruppen geringere Schwankungen als bei der Auswertung mit Hilfe des TOM.

In den Diagrammen wurden wieder jeweils die Medianwerte für die unbestrahlten Kontrollen und für die Proben unmittelbar nach Bestrahlung sowie nach einer Reparaturzeit von 15 min und 60 min als *Boxplots* aufgetragen. Die Erklärung des Boxplots und die Definition der Maße befindet sich in Kapitel 4.1.1.2. Wie bereits in der statistischen Auswertung mit Hilfe

des TOM konnte auch für die Auswertung mittels DNA-Gehalt im Schweiß ein Anstieg der Werte unmittelbar nach Bestrahlung sowie ein Rückgang auf nahezu den Wert vor Bestrahlung im Verlauf der Zeit festgestellt werden. Im Gegensatz zu der Auswertung mit Hilfe des TOM konnten hier die drei unterschiedlichen Auswertungsgruppen direkt verglichen werden, da die Einheit „Prozent des DNA-Gehalts im Schweiß“ in allen Systemen verwendet wird. KORA-Gruppe 2 und 3 zeigten mit einem Anstieg auf den 3,8 - bzw. 4,5 -fachen Wert der unbestrahlten Proben ähnliche Ergebnisse, während KORA-Gruppe 1 mit einem Anstieg auf den 6,3 -fachen Wert etwas höher lag. Der in Abbildung 18 erkennbare deutlich stärkere Anstieg in KORA-Gruppe 3 gegenüber KORA-Gruppe 2 bestätigte sich nach Berechnungen der DNA-Reparaturkapazität DRC (*DNA repair capacity*) nicht, da die unbestrahlte Kontrolle ebenfalls einen höheren Wert zeigt. Die Medianwerte des DNA-Gehalts im Schweiß in den unbestrahlten Kontrollen lagen in KORA-Gruppe 1 bei 2,6%, in KORA-Gruppe 2 bei 1,9% und in KORA-Gruppe 3 bei 5,4%. Für die beiden LUCY-Gruppen konnten mit einem Anstieg auf den 5,0 -fachen Wert der unbestrahlten Kontrolle in Gruppe 1 und einem Anstieg auf den 4,4 -fachen Wert in Gruppe 2 vergleichbare Werte wie in den KORA-Gruppen gefunden werden. Die Anfangswerte der unbestrahlten Proben lagen bei 3,3% in LUCY-Gruppe 1 und bei 2,1% in LUCY-Gruppe 2. Auffällig war hier, dass in LUCY-Gruppe 2 unmittelbar nach Bestrahlung eine sehr große Streuung der Werte vorlag.



**Abbildung 19: Darstellung der einer Gruppennormalisierung unterzogenen Medianwerte des relativen DNA-Gehalts im Schweiß der einzelnen Gruppen für die unbestrahlten Proben zum Zeitpunkt 0.**

Der Gesamtmedian wurde aus den jeweiligen Medianwerten des DNA-Gehalts im Schweiß der individuellen Proben ermittelt. Die Normalisierung der Gruppen erfolgte auf den Median der unbestrahlten Proben des KORA-Kollektivs.

**A:** Normalisierte Werte für die KORA-Gruppen.

**B:** Normalisierte Werte für die LUCY-Gruppen.

Die für die Proben des LUCY-Kollektivs ermittelten Werte zeigten, besonders in Auswertungsgruppe 2, deutlich breitere Streuung als die Werte, die für Proben des KORA-Kollektivs gewonnen werden konnten.

Um analog zur Auswertung mit Hilfe des TOM die unterschiedlichen Anfangsverteilungen in den einzelnen Gruppen ermitteln und vergleichen zu können, wurde ebenfalls eine Gruppennormalisierung der jeweiligen Werte der unbestrahlten Proben auf den Median der unbestrahlten Proben des KORA-Kollektivs der jeweiligen Auswertungsgruppe durchgeführt (Abbildung 19).

Nach dieser Normalisierung lagen die Mediane der unbestrahlten Proben des KORA-Kollektivs für jede Auswertungsgruppe wieder bei eins, für das LUCY-Kollektiv lagen sie in Gruppe 1 um den Faktor 1,3 höher, in Gruppe 2 nur um den Faktor 1,1. Für beide LUCY-Auswertegruppen war die Streuung etwas breiter als in der zugehörigen KORA-Gruppe, am deutlichsten war dies in Auswertungsgruppe 2 zu sehen.

#### 4.1.1.4 Statistische Auswertung des *Comet Assay*

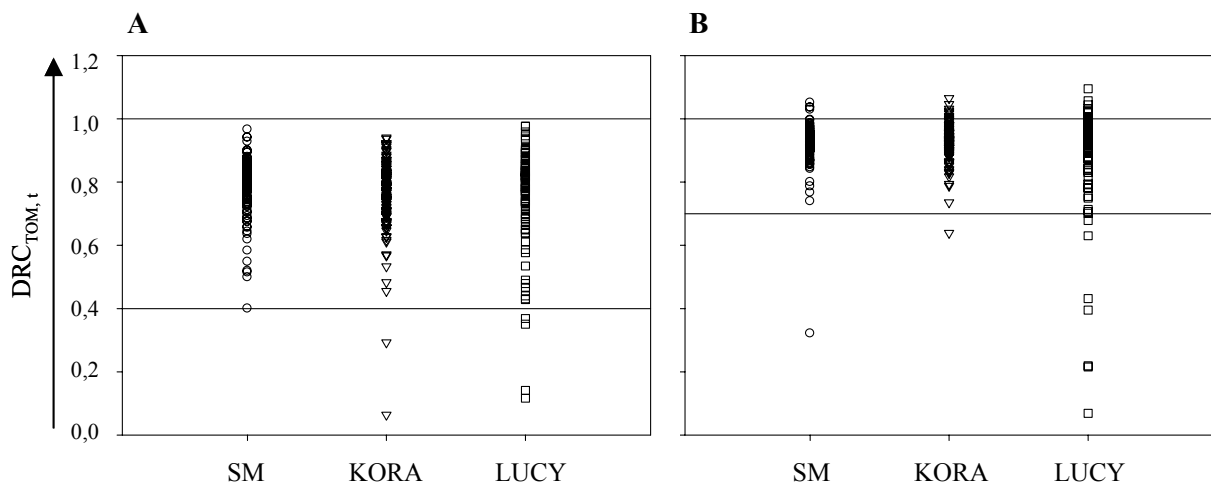
Die statistische Auswertung des alkalischen *Comet Assay* erfolgte unter Verwendung der DNA-Reparaturkapazität DRC (*DNA repair capacity*). Diese wird für die Auswertung mit Hilfe des TOM nach der Formel

$$\text{DRC}_{\text{TOM}, t} = 1 - \frac{\text{Median TOM}(4 \text{ Gy}, t) - \text{Median TOM}(0 \text{ Gy, gesamt})}{\text{Median TOM}(4 \text{ Gy}, 0 \text{ min}) - \text{Median TOM}(0 \text{ Gy, gesamt})}$$

mit  $t = 15 \text{ min}$  und  $t = 60 \text{ min}$  berechnet. Der Median TOM (0 Gy, gesamt) wurde aus den zu den verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 15 min und 60 min) gesammelten Werten der individuellen unbestrahlten Kontrollen für jede Probe berechnet und stellt den Hintergrundschaden dar, den eine unbehandelte Probe aufweist. Dieser Schaden wurde in der Formel berücksichtigt, indem er von dem Schaden zum jeweiligen Zeitpunkt abgezogen wurde. Da sich die Werte nach 120 min nicht deutlich von den Werten nach 60 min unterschieden und auch nur unvollständig erhoben wurden, erfolgt die weitere Auswertung nur noch für die Zeitwerte 15 min und 60 min nach Bestrahlung.

In Tabelle 6 im Anhang sind die mit Hilfe des TOM ermittelten Werte der  $\text{DRC}_{\text{TOM}, t}$  für die Kontrollprobe SM der einzelnen Experimente nach 15 min und nach 60 min Reparaturdauer dargestellt. Anhand der Streuung der für die Kontrollprobe gewonnenen Daten konnten für die Proben der untersuchten Kollektive Grenzwerte festgelegt werden, anhand derer Ausreißer klassifiziert werden konnten. In Tabelle 7 und Tabelle 8 im Anhang sind die ermittelten Werte für die Proben des KORA-Kollektivs (Tabelle 7) und der LUCY-Kohorte (Tabelle 8) dargestellt.

Die Werte der  $DRC_{TOM, t}$  für Standardkontrolle SM und die beiden Kollektive sind in Abbildung 20 als *Dot Blot* dargestellt. SM kennzeichnet die Werte der Standardkontrolle, KORA die Werte der Proben des KORA-Kollektivs und LUCY die Werte der Proben von Patienten der LUCY-Kohorte. Anhand der Werte, die für die Standardkontrolle SM ermittelt wurden, konnte die versuchsbedingte intraindividuelle Schwankung der Werte festgestellt werden. Hieraus konnte dann der Faktor für die interindividuelle Schwankung errechnet werden.



**Abbildung 20:** Werte der mit Hilfe des TOM im *Comet Assay* ermittelten  $DRC_{TOM, t}$  der Proben des KORA-Kollektivs und der LUCY-Kohorte sowie der Standardkontrolle SM.

**A:** Werte der  $DRC_{TOM, t}$  mit  $t = 15$  min.

**B:** Werte der  $DRC_{TOM, t}$  mit  $t = 60$  min.

Unter SM sind jeweils die Werte für die Standardkontrolle SM angegeben, KORA steht für die Werte der Proben des KORA-Kollektivs und LUCY für Werte in Proben der LUCY-Kohorte. Die kurze gestrichelte Linie markiert jeweils den Median der Werte. Anhand des auf eine Stelle gerundeten Werts der Streuung der Standardkontrolle, deren unterer Extremwert hier als die untere der beiden waagrechten Linien dargestellt ist, konnten „Ausreißer“ in den Werten der beiden untersuchten Kollektive identifiziert werden. In den Werten für  $t = 60$  min der Standardkontrolle wird der Einzelwert bei ca. 0,3 nicht berücksichtigt, da dieser Wert deutlich außerhalb der größten Streuung aller anderen Werte liegt. Als „Ausreißer“ wurden diejenigen Proben betrachtet, deren ermittelte Werte für die  $DRC_{TOM, t}$  unterhalb der unteren Begrenzung liegen. Die obere der waagrechten Linien dient zur Orientierung und liegt bei einer  $DRC_{TOM, t}$  von eins. Eine  $DRC_{TOM} > 1$  ist theoretisch nicht möglich, da  $DRC_{TOM} = 1$  Reparatur zu 100% bedeutet. Werte, die oberhalb dieser Grenze liegen, lassen sich durch versuchsbedingte Schwankungen erklären.

In Abbildung 20A sind die jeweiligen Werte der  $DRC_{TOM}$  nach einer Reparaturdauer von 15 min, in Abbildung 20B nach einer Reparaturdauer von 60 min dargestellt. Die obere der beiden waagrechten Linien in beiden Abbildungen liegt bei dem Wert  $DRC_{TOM} = 1$ . Eine  $DRC_{TOM} > 1$  ist prinzipiell nicht möglich, da  $DRC_{TOM} = 1$  eine Reparatur von 100% bedeutet. Die Werte der  $DRC_{TOM, t}$ , die über diesen theoretisch gesetzten Schwellen lagen und ausschließlich nach einer Reparaturdauer von 60 min beobachtet wurden, lassen dadurch erklären, dass durch versuchsbedingte Schwankungen der „Median TOM (4 Gy, t)“ bei



erfolgter Reparatur kleiner sein kann als der „Median TOM (0 Gy, gesamt)“. Durch diesen Effekt wird ein negativer Wert im Dividenden erreicht, der dann zu Werten größer als 1 für die Gesamtrechnung führt.

Die untere der waagrechten Linien kennzeichnet den auf eine Stelle gerundeten Wert der Streuung der Werte der Standardkontrolle SM. Für die Ergebnisse der Versuche mit  $t = 60$  min wurde der einzelne Wert bei etwa 0,3 als Ausreißer definiert. Anhand dieser Streuung, die der versuchsbedingten Streuung entspricht, konnten die „Ausreißer“ in den Proben der untersuchten Kollektive identifiziert werden.

Anhand der jeweils höchsten und niedrigsten Werte der  $DRC_{TOM, t}$  für die Standardkontrolle SM konnte die intraindividuelle Schwankung ermittelt werden. Analog dazu wurde die interindividuelle Schwankung für das KORA-Kollektiv und die LUCY-Kohorte ermittelt. Eine Normalisierung der interindividuellen Schwankung der Werte für die beiden Kollektive auf die intraindividuelle Schwankung der Werte der SM Kontrolle ergab für das KORA-Kollektiv eine Schwankung, die um den Faktor 1,3 bis 1,4 höher lag als die intraindividuelle Schwankung und für die LUCY-Kohorte den Faktor 1,5 bis 2,9.

Die Auswertung mit Hilfe des relativen DNA-Gehalts im Schweif erfolgte entsprechend unter Verwendung der Formel

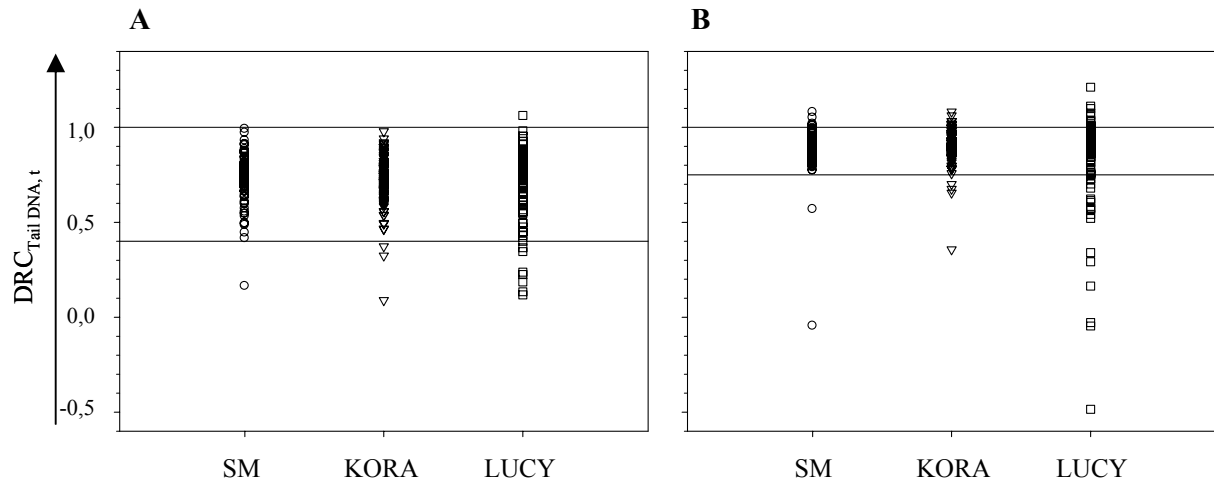
$$DRC_{Tail\ DNA, t} = 1 - \frac{\text{Median Tail DNA}(4\text{ Gy}, t) - \text{Median Tail DNA}(0\text{ Gy, gesamt})}{\text{Median Tail DNA}(4\text{ Gy}, 0\text{ min}) - \text{Median Tail DNA}(0\text{ Gy, gesamt})}$$

mit  $t = 15$  min und  $t = 60$  min. Der Median Tail DNA (0 Gy, gesamt) wurde wieder aus den zu den verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 15 min und 60 min) gesammelten Werten der individuellen unbestrahlten Kontrollen für jede Probe berechnet.

Die Werte für die mit Hilfe des relativen DNA-Gehalts im Schweif errechnete Reparaturkapazität  $DRC_{Tail\ DNA, t}$  wurden in der gleichen Weise für die Kontrollprobe in Tabelle 9, für die Proben des KORA-Kollektivs in Tabelle 10 und für die Proben der LUCY-Kohorte in Tabelle 11 jeweils im Anhang angegeben.

In Abbildung 21 sind die Werte der  $DRC_{Tail\ DNA, t}$  für die Standardkontrolle SM und für die beiden Kollektive dargestellt. Die Werte der Standardkontrolle wurden wieder als SM kennzeichnet, die der Proben des KORA-Kollektivs als KORA und die der Proben von Patienten der LUCY-Kohorte als LUCY.

Die obere Linie in Abbildung 21 kennzeichnet wie in Abbildung 20 den Wert  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}} = 1$ , die untere den auf eine Stelle gerundeten Wert der maximalen Streuung der Standardkontrolle, bei der jeweils einzelne „Ausreißer“ nicht berücksichtigt wurden.



**Abbildung 21:** Werte der mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im *Comet Assay* ermittelten  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$  der Proben des KORA-Kollektivs und der LUCY-Kohorte sowie der Standardkontrolle SM.

**A:** Werte der  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$  mit  $t = 15$  min.

**B:** Werte der  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$  mit  $t = 60$  min.

Unter SM sind jeweils die Werte für die Standardkontrolle SM angegeben, KORA steht für die Werte der Proben des KORA-Kollektivs und LUCY für Werte in Proben der LUCY-Kohorte. Die kurze gestrichelte Linie markiert jeweils den Median der Werte. Anhand des auf eine Stelle gerundeten Wert der Streuung der Werte der Standardkontrolle ohne Berücksichtigung einzelner „Ausreißer“, deren unterer Extremwert hier als die untere der beiden waagrechten Linien dargestellt ist, konnten „Ausreißer“ in den Werten der beiden untersuchten Kollektive identifiziert werden. Als „Ausreißer“ wurden diejenigen Proben betrachtet, deren ermittelte Werte für die  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$  unterhalb der unteren Begrenzung liegen. Die obere der waagrechten Linien dient zur Orientierung und liegt bei einer  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$  von eins. Eine  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t} > 1$  ist theoretisch nicht möglich, da  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t} = 1$  Reparatur zu 100% bedeutet. Im Vergleich mit den Werten der  $\text{DRC}_{\text{TOX}, t}$  ist die Streuung für die Werte der  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}, t}$  nach 60 min Reparaturdauer deutlich geringer.

Die Probennummern sowie die Werte der  $\text{DRC}_{\text{TOX}}$  und  $\text{DRC}_{\text{Tail DNA}}$  der Proben, die unter Berücksichtigung der verschiedenen Parameter als „Ausreißer“ klassifiziert wurden, wurden in Tabelle 12. zusammengefasst (siehe Anhang).

Analog zur Auswertung mit Hilfe des TOM konnte auch hier festgestellt werden, um welchen Faktor die interindividuelle Schwankung der Werte der beiden Kollektive höher war als die intraindividuelle Schwankung der Werte, die für die Standardkontrolle SM gewonnen wurden. Für die KORA-Kohorte ergab sich der Faktor 1,5 bis 2, für das LUCY-Kollektiv der Faktor 1,5 bis 2,9.

### 4.1.2 Untersuchungen zu *XRCC1*

#### 4.1.2.1 Vergleichende Untersuchungen an Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus *XRCC1* Arg280His aufweisen

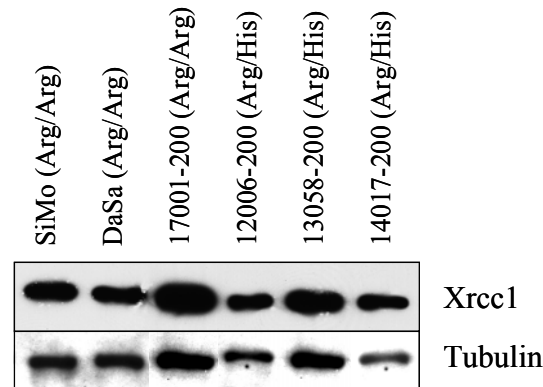
Die Reparatur von strahleninduzierten SSB, die mit Hilfe des *Comet Assay* untersucht wurde, basiert zum einen auf direkter Verknüpfung von „sauberen“ Bruchenden, zum anderen erfolgt die Reparatur für „unsaubere“ Brüche, die 5' - OH -Gruppen, phosphorylierte 3' -Enden oder gespaltene Zuckerreste aufweisen. In beide Reparaturwege ist die Basenexzisionsreparatur (BER, siehe Kapitel 2.1.3) involviert. Ein Protein, das in der SSB-Reparatur, aber auch in der Reparatur von abasischen Stellen eine große Rolle spielt, ist das Produkt des *XRCC1*-Gens (*X-ray repair cross complementing 1*), dessen Funktion in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben wurde. Mutationen dieses Gens könnten dazu führen, dass die BER nicht mehr oder in verringertem Maß stattfinden kann. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurden Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) *XRCC1* Arg280His aufweisen, untersucht.

Bei den ausgewählten Zelllinien handelt es sich um einen homozygoten Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) (19021-200), drei für diesen Polymorphismus heterozygote Zelllinien (12006-200, 13058-200 und 14017-200) sowie einen homozygoten Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) (17001-200). Die Zelllinie SiMo, die in allen Versuchen mit diesen Zelllinien als Kontrollzelllinie eingesetzt wurde, stammt von einer Spenderin, die ebenfalls homozygot Trägerin des häufigen Allels ist.

#### 4.1.2.2 Quantifizierung von *Xrcc1* in Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus *XRCC1* Arg280His aufweisen

Um festzustellen, ob Zellen von Trägern des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) verminderten oder erhöhten Gehalt an *Xrcc1* aufweisen im Vergleich zu homozygoten Trägern des häufigen Allels, wurden an vier der fünf ausgewählten Zelllinien sowie zwei Kontrollzelllinien (SiMo und DaSa) von Spendern, die homozygot Träger des häufigen Allels sind, *Western Blot* Analysen unter Verwendung eines Antikörpers gegen *Xrcc1* durchgeführt. Als Beladungskontrolle diente die Immundetektion des Haushaltsgens Tubulin. Für die Zelllinie, die homozygot Träger des häufigen Allels ist, war die Untersuchung aufgrund des extrem schlechten Wachstums der Zellkultur nicht möglich. Die Darstellung in Abbildung 22 zeigt die Proteinbanden der sechs Zelllinien für die Proteine *Xrcc1* und Tubulin.

Die Intensitäten der resultierenden Proteinbanden wurden mit Hilfe der Software ImageMaster TotalLab quantitativ erfasst und jeweils die Werte für die Xrcc1 Banden auf die Banden für Tubulin normalisiert.



**Abbildung 22: Darstellung der Proteinbanden von Xrcc1 und Tubulin für Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His.**

Gezeigt werden die Ergebnisse für Zellextrakte der Kontrollzelllinien SiMo und DaSa sowie der LUCY-Zelllinie 17001-200, die homozygot Träger des häufigen Allels sind, sowie den LUCY-Zelllinien 12006-200, 13058-200 und 14017-200, die für den Polymorphismus heterozygot sind. Anhand der Proteinbande für Tubulin konnte festgestellt werden, dass etwaige Unterschiede in der Intensität der Proteinbande für Xrcc1 auf unterschiedlich aufgetragener Proteinmenge beruhen und nicht auf verschiedenem Gehalt an Xrcc1 der Zellen in den verschiedenen Zelllinien.

Die so erhaltenen Werte für das Verhältnis zwischen der Xrcc1-Proteinmenge und der Menge an Tubulin gaben Aufschluss darüber, ob im Bezug auf die Gesamtproteinmenge unterschiedliche Mengen an Xrcc1 in den verschiedenen Zelllinien vorlagen. In Tabelle 5 sind die resultierenden Verhältnisse der Proteinmengen zusammengefasst.

**Tabelle 5: Quantitative Auswertung der Proteinbanden von Xrcc1 und Tubulin für Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His.**

Die Werte resultierten aus einer Normalisierung der Intensität der Proteinbande von Xrcc1 auf die Intensität der Proteinbande von Tubulin, die jeweils mit Hilfe der Software ImageMaster TotalLab quantitativ erfasst wurden.

Zelllinie	SiMo	DaSa	17001-200	12006-200	13058-200	14017-200
Xrcc1 / Tubulin	2,4	2,2	2,9	2,2	2,4	2,0

Die Zelllinien mit verschiedenem Allelstatus zeigen ähnliche Werte im Bereich zwischen 2,0 und 2,3 für den relativen Gehalt an Xrcc1. Lediglich die Zelllinie 17001-200 zeigt mit einem Wert von 2,9 leicht erhöhte Menge an Xrcc1. Da dieser Unterschied in den beiden Kontrollzelllinien, die wie 17001-200 für das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) homozygot sind, nicht auftrat, kann ein Zusammenhang zwischen Allelstatus und Proteinmenge ausgeschlossen werden. Etwaige Unterschiede in den folgenden funktionellen Analysen der

untersuchten Zelllinien basierten entsprechend auf der Proteinaktivität von Xrcc1 und nicht auf verschiedener Konzentration des Proteins in den Zellen.

#### 4.1.2.3 Quantifizierung des $\text{NAD}^+$ -Gehalts

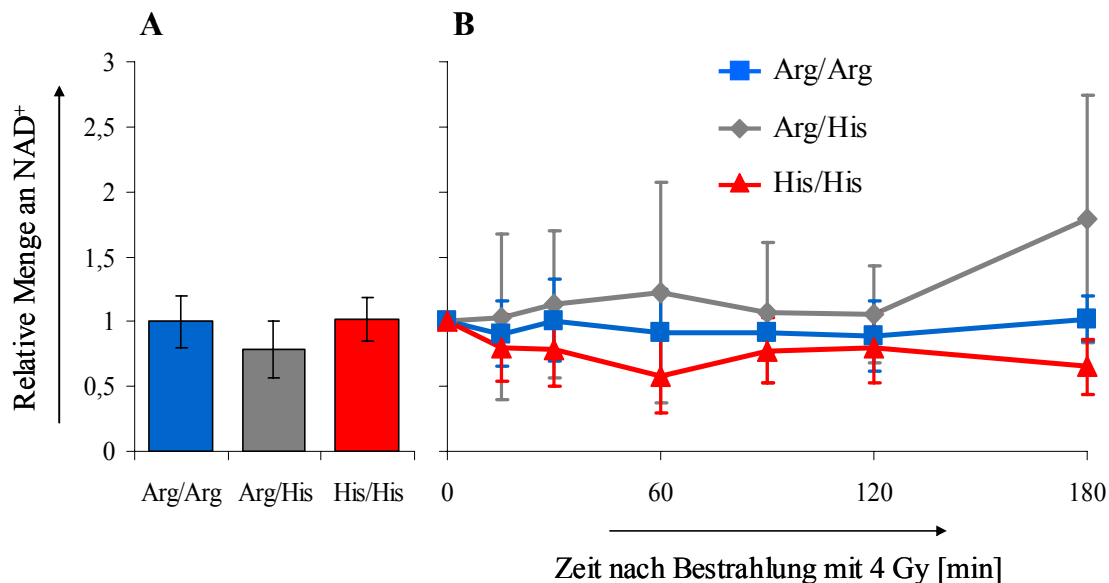
Die Quantifizierung des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts mit Hilfe eines zyklischen *Enzymassays* wurde durchgeführt, um Aufschluss über den Einfluss des speziellen Polymorphismus im *XRCC1*-Gen auf die Reparatur von Basenschäden und SSB nach ionisierender Bestrahlung und Behandlung mit MMS zu erhalten. In diesem Versuch wurde die Aktivität von Parp1 untersucht, das unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  Poly(ADP)ribosepolymere synthetisiert. Dies gibt indirekt Aufschluss über die Aktivität von Xrcc1 bei der Reparatur von Basenschäden, da Xrcc1 durch Parp1 an die Schadensstelle rekrutiert wird. Xrcc1 spielt eine wichtige Rolle in der BER (siehe Kapitel 2.1.3.1), daher war zu erwarten, dass eine funktionelle Veränderung des Proteins oder ein verminderter Proteingehalt zu einer stärkeren Verarmung des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts führt (Brem und Hall, 2005).

##### ***4.1.2.3.1 Quantifizierung des $\text{NAD}^+$ -Gehalts in Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus *XRCC1* Arg280His aufweisen nach Behandlung mit verschiedenen Noxen***

Für Zelllinien mit verschiedenem Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His sollten Unterschiede in der Verarmung an  $\text{NAD}^+$  nach DNA-Schädigung durch ionisierende Bestrahlung festgestellt werden können, wenn der SNP eine funktionelle Veränderung des Gens in der SSB-Reparatur bewirkt.

Zunächst wurde in zwei bis drei unabhängigen Messungen die Menge an  $\text{NAD}^+$  in Zellextrakten der Zelllinien vor Bestrahlung sowie zu verschiedenen Zeitwerten bis zu 180 min nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy gemessen. Um die relative Menge an  $\text{NAD}^+$  zu erhalten, wurde die gemessene Menge zu jedem Zeitpunkt auf die gemessene Menge vor Bestrahlung normalisiert (Abbildung 23B). Die relative Menge  $\text{NAD}^+$  vor Bestrahlung bezieht sich auf den Wert der Kontrollzelllinie SiMo (Abbildung 23A). Für die Zelllinien, die für eines der beiden Allele homozygot Träger sind, konnte kein Unterschied in der an  $\text{NAD}^+$  festgestellt werden. Die heterozygoten Träger des SNP wiesen eine etwas geringere Menge an  $\text{NAD}^+$  auf (Abbildung 23A). Eine Abhängigkeit der initialen  $\text{NAD}^+$ -Menge von dem jeweiligen Allelstatus konnte somit nicht belegt werden. Nach Bestrahlung konnte für keine

der Gruppen mit einem bestimmten Allelstatus eine eindeutige Abnahme der  $\text{NAD}^+$ -Menge festgestellt werden, die Werte schwankten um den Ausgangswert (Abbildung 23B).



**Abbildung 23:**  $\text{NAD}^+$ -Gehalt von LUCY-Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus *XRCC1* Arg280His aufweisen vor und nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy.

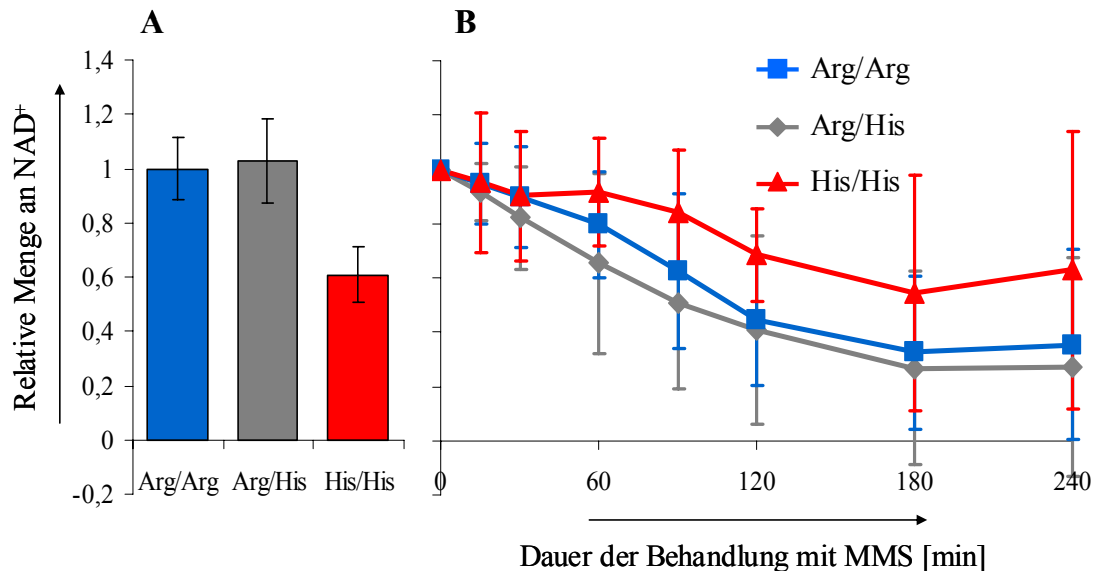
**A:** Mittelwert des relativen  $\text{NAD}^+$ -Gehalt von Zelllinien, die homozygot Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sind (blau: SiMo, 17001-200), Zelllinien, die für den SNP heterozygot sind (grau: 12006-200, 13058-200, 14017-200) und einer Zelllinie, die homozygot das seltene Allel (*XRCC1* 280His) trägt (rot: 19021-200). Die ermittelten Mengen wurden auf den  $\text{NAD}^+$ -Gehalt der homozygoten Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) normalisiert. Die Zelllinien, die homozygot für eines der Allele sind, wiesen etwa gleichen  $\text{NAD}^+$ -Gehalt vor Behandlung auf, die heterozygoten Träger etwas geringeren  $\text{NAD}^+$ -Gehalt.

**B:** Gezeigt wird die relative Änderung der  $\text{NAD}^+$ -Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung. Keine der untersuchten Gruppen zeigte eine eindeutige Ab- oder Zunahme des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts.

Es ist zu vermuten, dass der Versuch zur Quantifizierung von  $\text{NAD}^+$  nicht empfindlich genug ist, um die relativ geringe SSB-Reparatur / BER nach ionisierender Strahlung zu erfassen.

Daher wurde im nächsten Ansatz der  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch der Zelllinien nach Behandlung der Kultur mit MMS gemessen. Dieser Versuch konnte mit einem erweiterten Kollektiv an LUCY-Zelllinien durchgeführt werden, die unter Berücksichtigung des Allelstatus im Polymorphismus *XRCC1* Arg280His vom Institut für Epidemiologie im Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich hierbei um einen homozygoten Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) (13019-200), zwei weitere heterozygote Zelllinien (8008-200 und 19033-200) sowie zwei homozygote Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) (8062-200 und 13070-200). Die relative Menge an  $\text{NAD}^+$  wurde in vier bis fünf unabhängigen Versuchen vor Behandlung und zu verschiedenen Zeitpunkten bis 240 min nach Zugabe von MMS ermittelt und wie bereits beschrieben dargestellt (Abbildung 24).

Die Zelllinien, die das häufige Allel in wenigstens einer Kopie tragen, wiesen wie schon im vorhergehenden Versuchsansatz etwa gleichen  $\text{NAD}^+$ -Gehalt auf. Die für das seltene Allel homozygoten Zelllinien wiesen im Gegensatz zu der Versuchsreihe nach ionisierender Bestrahlung (Abbildung 24A) bereits vor Behandlung mit MMS einen deutlich reduzierten Gehalt an  $\text{NAD}^+$  von ca. 60% der homozygoten Träger des seltenen Allels auf (Abbildung 24A).



**Abbildung 24:  $\text{NAD}^+$ -Gehalt von Zelllinien, die verschiedenen Allelstatus für den Polymorphismus *XRCC1* Arg280His aufweisen vor und nach Behandlung mit 1 mM MMS.**

**A:** Mittlerer  $\text{NAD}^+$ -Gehalt von Zelllinien, die homozygot Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sind (blau: SiMo, 17001-200, 8062-200, 13070-200), Zelllinien, die für den SNP heterozygot sind (grau: 12006-200, 13058-200, 14017-200, 8008-200, 19033-200) und Zelllinien, die homozygot das seltene Allel (*XRCC1* 280His) tragen (rot: 19021-200, 13019-200). Die ermittelten Mengen wurden auf den  $\text{NAD}^+$ -Gehalt der homozygoten Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) normalisiert. Die homozygoten Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sowie die für den SNP heterozygoten Zelllinien wiesen im Mittelwert der einzelnen Versuche etwa gleichen  $\text{NAD}^+$ -Gehalt vor Behandlung auf, die homozygoten Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) wiesen einen leicht reduzierten Gehalt an  $\text{NAD}^+$  auf.

**B:** Gezeigt wird die relative Änderung der  $\text{NAD}^+$ -Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Behandlung mit MMS. Für alle Versuchsgruppen war eine Abnahme der  $\text{NAD}^+$ -Menge zu verzeichnen. Aufgrund der großen Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, allerdings zeigten die für das seltene Allel homozygoten Zelllinien eine leicht reduzierte Verarmung an  $\text{NAD}^+$ .

In der Zeitreihe zeigten alle Gruppen von Zelllinien eine kontinuierliche Abnahme des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts. Allerdings konnte für die homozygoten Träger des seltenen Allels eine etwas schwächere Abnahme der  $\text{NAD}^+$ -Menge festgestellt werden (Abbildung 24B).

#### 4.1.2.4 Vergleichende Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur

Die vergleichende Quantifizierung von BER-Produkten erfolgte nach Harrigan (*et al.*, 2006). Sie stellt eine Möglichkeit dar, die Aktivität der beiden Reparaturwege der BER in verschiedenen Zellextrakten zu vergleichen. Zellextrakte von Zellen, die einen Defekt in der BER aufweisen, sollten in diesem Versuche geringere Mengen an BER-Produkten erzeugen oder einen verzögerten Beginn der Reparatur zeigen im Vergleich mit Zellen mit intakter BER. In der vorliegenden Arbeit sollte die Quantifizierung von BER-Produkten verwendet werden, um die Aktivität von Xrcc1 in Zellextrakten, die aus Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus bezüglich *XRCC1* Arg280His gewonnen werden, zu vergleichen. Als Positivkontrolle wurde der Versuch vergleichend an Zelllinien mit mittels RNAi-Technik reduziertem Gehalt an Xrcc1 und Zelllinien, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, durchgeführt.

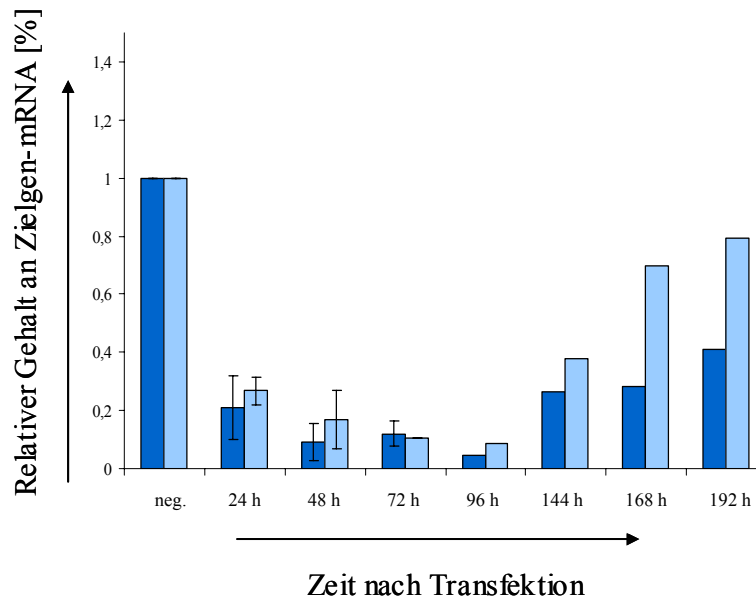
##### 4.1.2.4.1 Überprüfen der Qualität der Positivkontrolle für die Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur

Mit Hilfe der quantitativen *real-time-PCR* im *LightCycler* wurde die Effizienz der Herunterregulierung von Xrcc1 mit den beiden siRNAs überprüft. Als Kontrolle für die eingesetzte Menge an RNA wurde in jedem Ansatz die Menge an mRNA des Haushaltsgens *B2M* bestimmt. In der Darstellung wurde die Menge an vorhandener mRNA in den einzelnen Proben auf die RNA Menge der Negativkontrolle normalisiert.

Die maximale Verarmung auf RNA Ebene fand sich im Zeitraum ein bis vier Tage nach Transfektion, Versuche wurden daher in diesem Zeitfenster durchgeführt (Abbildung 25). Die siRNA *XRCC1\_1* gewährleistet eine deutlich bessere und länger anhaltende Herunterregulierung, für weitere Untersuchungen wurde daher diese siRNA bevorzugt.

Durch eine SDS-PAA-Gelelektrophorese von Proteinen mit anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Immundetektion (*Western Blot*, nach Towbin *et al.*, 1979) konnte die Effizienz der Herunterregulierung zusätzlich auf Proteinebene überprüft werden. Die Immundetektion erfolgte hier für Xrcc1 und für Tubulin. Tubulin ist das Genprodukt eines Haushaltsgens, das in allen Zellen in etwa in gleicher Menge vorhanden sein sollte und daher als Beladungskontrollen fungieren kann.





**Abbildung 25: Relativer Gehalt an mRNA für das Zielgen zu einigen Zeitpunkten nach Transfektion.**

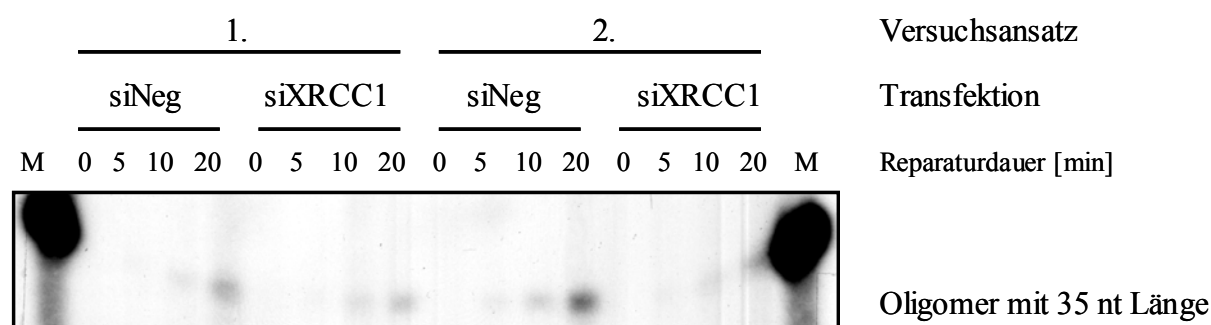
Die Menge an vorhandener mRNA wurde auf die RNA Menge der Negativkontrolle normalisiert. Für beide untersuchten siRNAs war der effektivste Zeitpunkt der Herunterregulierung zwischen 24 h und 96 h nach Transfektion festzustellen. Dunkelblau steht für XRCC1\_1, hellblau für XRCC1\_2.

Die Effizienz der Herunterregulierung von Xrcc1 wurde auf Proteinebene zu den gleichen Zeitpunkten überprüft, die auch für die RNA Ebene verwendet wurden. Für Xrcc1 zeigte sich eine ausreichende Verarmung an Protein wie auch bereits in den Versuchen mit RNA nach 24 h bis 96 h. Zu späteren Zeitpunkten stieg die Proteinmenge wieder deutlich an, hatte jedoch auch nach 192 h noch nicht das normale Maß erreicht. Der Unterschied zwischen XRCC1\_1 und XRCC1\_2 trat nicht so deutlich zu Tage wie auf RNA Ebene, konnte aber in geringerem Maß festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

#### ***4.1.2.4.2 Vergleichende Quantifizierung von Produkten der Basenexzisions-reparatur in der Positivkontrolle***

Für den Vergleich zwischen Zellen mit vermindertem Gehalt an Xrcc1 und Zellen mit normalem Gehalt an Xrcc1 wurde ein Zellextrakt aus RPE-Zellen mit herunterreguliertem Xrcc1 sowie ein Kontrollzellextrakt aus Zellen, die durch siNeg transfiziert wurden, gewonnen. Den Zellextrakten wurde das dsDNA-Oligonukleotid BER1 / BER2 mit einer Länge von 35 nt, das an der Stelle eines Cytosins bei 21 nt ein Uracil aufweist, zugesetzt. Durch die Proteine in dem Zellextrakt kann dieses Uracil erkannt und über BER-Wege mit einem zugegebenen radioaktiv markierten Nukleotid ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) ersetzt werden. Um die unbegrenzte Verlängerung des reparierten Einzelstrangs zu unterbinden, wird ein ddTTP als „Stopp-Nukleotid“ zugegeben, da die dem Uracil folgende Base ein Thymin ist. Je nach

bevorzugtem Reparaturweg (*short patch* oder *long patch*) entsteht unter Bedingungen, die Reparatur ermöglichen, ein radioaktiv markiertes 35mer oder ein 16mer, bei nicht vollendeten Reparaturereignissen entsteht ein Intermediat von 15 nt Länge. Die Ernte der Zellextrakte wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt, während die Bearbeitung dieser vier Zellextrakte in einem Versuchsansatz erfolgte. Proben wurden ohne Reparatur (nach 0 min), nach 5 min, 10 min und 20 min entnommen und dann nebeneinander auf das Gel aufgetragen (Abbildung 26). In einem 18%igen Polyacrylamidgel konnten diese Oligomere aufgetrennt werden, die Visualisierung erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.



**Abbildung 26: Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur im Polyacrylamidgel.**

Aufgetragen wurden von links nach rechts jeweils der erste Zellextrakt der mit siNeg und siXRCC1 behandelten Proben und der jeweils zweite Zellextrakt. Für jeden der Zellextrakte wurde eine Probe vor Reparatur und je eine nach 5 min, 10 min und 20 min entnommen und auf das Gel aufgetragen.

Die Bande entspricht dem Oligomer von 35 nt Länge, das im *short patch*-Reparaturweg gebildet wird. In beiden getrennten Ansätzen war die Intensität der Banden des Zellextraktes von für Xrcc1 herunterregulierten Zellen deutlich schwächer als die der Banden des Kontrollansatzes.

Nach Fortini und Dogliotti (2007) spielt das Xrcc1-Protein eine wichtige Rolle im *short patch*-Weg der BER, im *long patch*-Reparaturweg jedoch eine geringe Rolle. Dies spiegelte sich auch in den Intensitäten der Banden für das Oligonukleotid mit 16 nt Länge wieder. In beiden Versuchsansätzen war kein Unterschied zwischen den Zellen mit *knockdown* von *XRCC1* und den Kontrollzellen sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Die weitere Auswertung der Quantifizierung von BER-Produkten bezieht sich entsprechend nur auf das Produkt des *short patch*-Reparaturwegs. Das *short patch*-Reparaturprodukt mit einer Länge von 35 nt zeigte deutlich schwächere Banden in den für Xrcc1 herunterregulierten RPE-Zellen (Abbildung 26) im Vergleich mit Zellen, die normalen Gehalt an Xrcc1 aufwiesen. Mit Hilfe der Software Image Master TotalLab konnten die Intensitäten der Banden ermittelt werden. Die erhaltenen Werte für die Intensitäten der Banden wurden auf die Werte der Intensität der Kontrollbanden (siNeg in Abbildung 26) für die jeweilige Reparaturdauer normalisiert, um die quantitativen Unterschiede zwischen Zellen mit herunterreguliertem Xrcc1 und Kontrollzellen zu ermitteln (Abbildung 27, Kapitel 4.1.2.4.3).

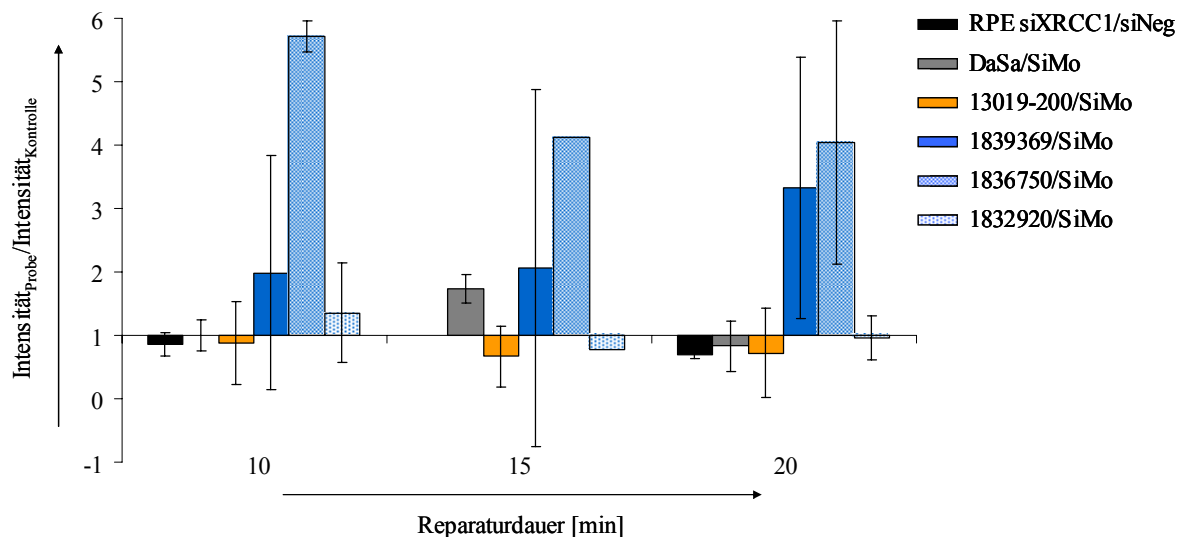
Da erst nach einer Reparaturdauer von 10 min deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben erkennbar waren, wurden zur Auswertung die Werte für eine Reparaturdauer von 10 min, 20 min, und, sofern vorhanden, 15 min herangezogen.

#### ***4.1.2.4.3 Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur für verschiedene Zelllinien***

In diesem Versuch wurden Zelllinien, die homozygot das seltene Allel (*XRCC1* 280His) tragen (13019-200, 1839369, 1836750 und 1832920) mit Kontrollen, die homozygot das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) tragen (SiMo, DaSa), verglichen. Die Zelllinien 1839369, 1836750 und 1832920 wurden aus Proben des KORA-Kollektivs gewonnen und wurden wie bereits die Zelllinien, die aus Proben des LUCY-Kollektivs hergestellt werden konnten, vom Institut für Epidemiologie im Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt. Der SNP *XRCC1* Arg280His tritt in einer Frequenz von ca. 0,004 - 0,013 auf (GeneSNPs Public Internet Resource). Aufgrund dieser geringen Frequenz konnten im LUCY-Kollektiv keine weiteren homozygoten Träger des seltenen Allels gefunden werden. Der Vergleich fand ausschließlich in homozygoten Zelllinien statt, da hier im Fall einer funktionellen Veränderung des Genprodukts durch den SNP *XRCC1* Arg280His größere Unterschiede zwischen den Zelllinien und der Kontrolle zu erwarten waren. Die Zellextrakte wurden in drei bis fünf unabhängigen Ansätzen gewonnen und in dreizehn unabhängigen Versuchen jeweils paarweise oder zu dritt verglichen. Die beiden Kontrollen SiMo und DaSa, die beide für diesen SNP homozygot Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sind, wurden in vier Versuchen miteinander verglichen, die Proben aus dem LUCY- und dem KORA-Kollektiv in zwei bis vier Experimenten. In die quantitative Auswertung gingen alle Werte ab einer Reparaturdauer von 10 min ein, da nach kürzeren Reparaturzeiten häufig keine Banden auf dem Film gefunden werden konnten.

Mit Hilfe der Software ImageMaster TotalLab konnten die Intensitäten der resultierenden Banden quantitativ erfasst werden. Die erhaltenen Werte für die Intensität der Banden zu den verschiedenen Reparaturdauern wurden jeweils auf die korrespondierende Kontrolle normalisiert, das hieß im Fall der Positivkontrolle, den RPE-Zellen mit herunterreguliertem *Xrcc1*, entsprechende RPE-Zellen ohne *knockdown* für *Xrcc1*, für die LCL diente allgemein die Zelllinie SiMo als Kontrolle. Für die in Abbildung 27 schwarz dargestellte Positivkontrolle sind nur Werte für die Reparaturdauer von 10 und 20 Minuten vorhanden. Sie zeigt eine Reduktion der Bandenintensität auf 70% bis 86%. Die durchgezogene Linie

verläuft bei dem Wert 1 und steht für mit der Kontrolle übereinstimmende Bandenintensität. Werte  $< 1$  bezeichnen entsprechend Proben mit geringerer Bandenintensität als die Kontrollprobe, Werte  $> 1$  Proben mit höherer Bandenintensität. Für die Zelllinie DaSa können dementsprechend Werte ermittelt werden, die etwa der Intensität der Banden in der Standardkontrolle SiMo entsprechen, nur bei einer Reparaturdauer von 15 min liegen sie um den Faktor 1,7 höher.



**Abbildung 27: Quantitative Auswertung der Reparaturprodukte des *short patch*-Weges der BER.**

Die dargestellten Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten der auf die Kontrollproben (siNeg für die Positivkontrolle, SiMo für die LCLs) normalisierten Werte der Intensität der Signale im Assay zur Analyse der BER-Produkte. Die durchgezogene Linie liegt bei 1, dies entspricht 100% der Reparatur in der jeweiligen Kontrollprobe. Werte  $< 1$  entsprechen reduzierter BER-Aktivität gegenüber der Kontrollprobe, Werte  $> 1$  entsprechen erhöhter BER-Aktivität.

In schwarz dargestellt sind die Werte der Positivkontrolle. Hier liegen Werte für die Reparaturdauer von 10 min und 20 min vor, die eine Reduktion auf 70% bis 86% der Reparaturprodukte in Zelllinien ohne Herunterregulierung von Xrcc1 anzeigen.

Die Werte der Zelllinie DaSa sind in grau, die Werte für die Zelllinie 13019-200 orange dargestellt. Für beide Linien konnte signifikanter Unterschied von der Standardkontrolle SiMo festgestellt werden, die Linie 13019-200 zeigte bei jeder Reparaturdauer lediglich eine leicht reduzierte Aktivität. In verschiedenen Blautönen sind die aus Proben des KORA-Kollektivs, deren Spender ebenfalls für das seltene Allel homozygot sind, hergestellten Zelllinien gezeigt. Die Probe 1839369 zeigte im Mittelwert einen Anstieg auf die 2 - 3 -fache Intensität der Banden der Kontrollzelllinie, der jedoch nicht als signifikant bewertet werden konnte. Die Probe mit der Nummer 1836750 wies eine 4 - 6 -fache Intensität der Banden auf, wohingegen die Zelllinie 1832920 im Mittelwert etwa gleiche Bandenintensität zeigte wie die Zelllinie SiMo.

Für die orange markierte Zelllinie 13019-200 konnte für alle Reparaturzeiten eine geringe Reduktion der Intensität der Banden auf 70% bis 90% der Bandenintensität der Kontrolle festgestellt werden. Die dunkelblau gezeigte Zelllinie 1839369 wies eine (allerdings nicht signifikante) 2 - 3 -fache, die mittelblau gekennzeichnete Zelllinie 1836750 sogar eine 4 - 6 -fache Intensität der Banden auf. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie 1832920 wie die Zelllinie DaSa etwa gleiche Intensität der Banden wie die Standardkontrollzelllinie. Aus

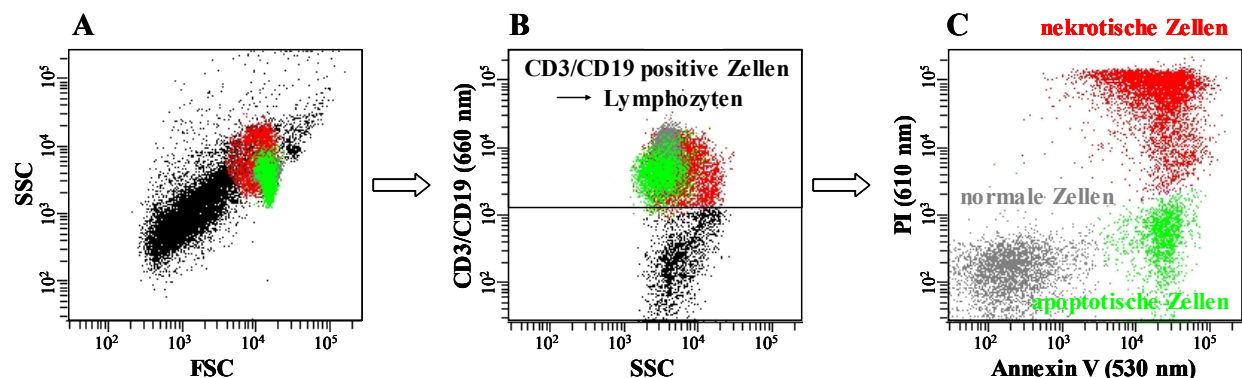
diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Anwesenheit von *Xrcc1* eindeutig eine Rolle bei der Aktivität der BER spielt (Abbildung 27, Positivkontrolle), der Allelstatus des SNP *XRCC1* Arg280His jedoch nicht (Abbildung 27, LCL).

## 4.2 Untersuchungen zur Apoptose

### 4.2.1 Analysen von primären Lymphozyten eines Patienten- und eines Kontroll-Kollektivs mittels Annexin V-Assay

Der Annexin V-Assay ist ein durchflusszytometrischer Test, der zur Quantifizierung der strahleninduzierten Apoptose in primären Lymphozyten geeignet ist (Vermes *et al.*, 1995).

Die aus Patientenblut isolierten Lymphozyten der LUCY-Patienten, aber auch etwas weniger stark die Proben der Freiwilligen des KORA-Kollektivs, zeigten in durchflusszytometrischen Tests starke Heterogenität und enthielten zelluläre Subpopulationen, durch die die Analysen im Durchflusszytometer deutlich erschwert wurden.



**Abbildung 28: Dot Plot der durchflusszytometrischen Analyse des Annexin V-Assays.**

**A:** Ansicht aller Signale gemessen als Vorwärtsstreuung auf der Abszisse gegen das Seitwärtsstreuung auf der Ordinate. Grau, rot und grün dargestellt ist die Lage der Lymphozyten in der Gesamtpopulation sichtbar.

**B:** Auswahl der mit den Antikörpern  $\alpha$ CD3- /  $\alpha$ CD19-markierten Lymphozyten. Die Antikörper sind mit Allophycocyanin konjugiert, dieses emittiert bei einer Wellenlänge von 660 nm.

**C:** Unterscheidung von normalen (grau, keine Fluoreszenz), apoptotischen (grün, Annexin V-positiv) und nekrotischen (rot, Annexin V- und PI-positiv) Zellen. Annexin V ist mit FITC konjugiert, FITC emittiert bei einer Wellenlänge von 530 nm, Propidiumiodid bei 610 nm, im Dot Plot wurde die Fluoreszenz bei 610 nm gegen die Fluoreszenz bei 530 nm aufgetragen.

Um die in den Lymphozytenpopulationen vorhandenen kontaminierenden Zellen besser von der Analyse auszuschließen, wurden die Lymphozyten vor dem eigentlichen Annexin V-Assay mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3 und CD19 behandelt. CD3 ist ein für T-Zellen spezifisches Oberflächenantigen, CD19 für B-Zellen. Die interessierenden Lymphozyten waren so von diesen Antikörpern dekoriert und ließen sich bei

der durchflusszytometrischen Analyse von den Zellen der unerwünschten Subpopulation abgrenzen (Abbildung 28). Die Auswahl der Antikörper gegen CD3 und CD19 wurde bereits in einem früheren Projekt der Arbeitsgruppe getroffen, da in verschiedenen Versuchsansätzen die Markierung der Lymphozyten durch einen Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD45, einen Oberflächenmarker, der generell von Lymphozyten exprimiert wird, nicht ausreichend erfolgreich war.

Die Analyse der Apoptose durch den Annexin V-Assay konnte für 96 Patienten der Lungentumor-Kohorte sowie für 113 gesunde Kontrollpersonen des KORA-Kollektivs durchgeführt werden. In jedem Versuchsansatz wurde zusätzlich eine interne Laborkontrolle, im Folgenden SM, mitgeführt, um die Schwankungen zwischen den Versuchen zu erfassen.

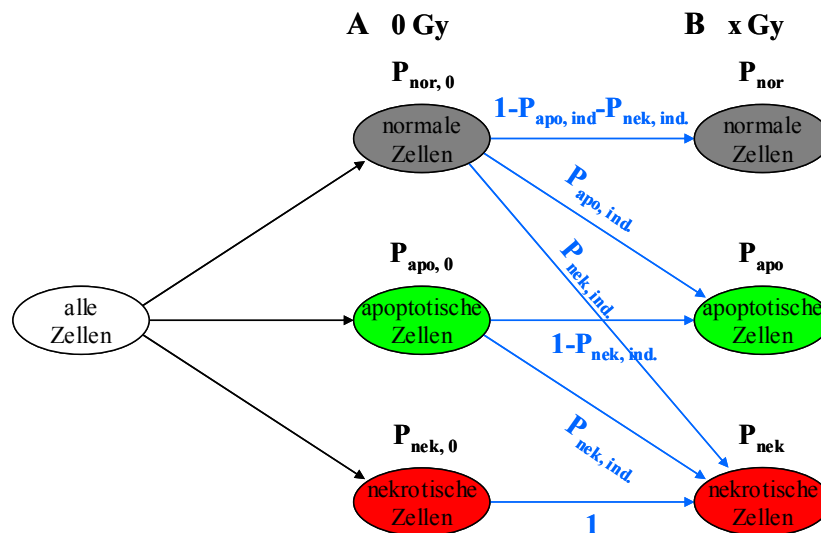
#### 4.2.1.1 Statistische Auswertung zum Annexin V-Assay zur Quantifizierung der induzierten Apoptose in Lymphozyten

Im Anschluss an die Erfassung der zytometrischen Daten erfolgte die statistische Auswertung unter Mithilfe von H. Braselmann aus der Arbeitsgruppe Zytogenetik des Instituts für Molekulare Strahlenbiologie im Helmholtz Zentrum München. Die Rate der strahleninduzierten Apoptose  $P_{apo, ind.}$  wurde mit Hilfe der Formel

$$P_{apo, ind.} = \frac{P_{apo} - P_{apo, 0} \cdot (1 - P_{nek, ind.})}{1 - P_{apo, 0} - P_{nek, 0}} \quad \text{mit} \quad P_{nek, ind.} = \frac{P_{nek} - P_{nek, 0}}{1 - P_{nek, 0}} \text{ berechnet.}$$

Die Formel basiert darauf, dass die Zellen während der Messung in einem der drei Zustände „normal“, „apoptotisch“ oder „nekrotisch“ vorliegen (Abbildung 29).

$P_{nor, 0}$  bezeichnet die Anfangswahrscheinlichkeit für eine Zelle, vor Bestrahlung in normalem Zustand zu sein.  $P_{apo, 0}$  und  $P_{nek, 0}$  bezeichnen die jeweiligen Anfangswahrscheinlichkeiten für die Zustände „apoptotisch“ bzw. „nekrotisch“. Die Ausgangswahrscheinlichkeiten können durch das Bestimmen der Ausgangshäufigkeiten für das Vorkommen der Zellen in den jeweiligen Zuständen in einer unbestrahlten Ausgangspopulation geschätzt werden.  $P_{nor}$ ,  $P_{apo}$  und  $P_{nek}$  bezeichnen die jeweiligen Wahrscheinlichkeiten für die Zustände „normal“, „apoptotisch“ bzw. „nekrotisch“ nach erfolgter Bestrahlung. Auch diese Wahrscheinlichkeiten können anhand der gemessenen Häufigkeiten für das Vorkommen der Zellen in den drei Zuständen nach Bestrahlung geschätzt werden.  $P_{nek, ind.}$  und  $P_{apo, ind.}$  bezeichnen die Übergangswahrscheinlichkeiten der induzierten Apoptose bzw. Nekrose.



**Abbildung 29: Stochastischer Graph für die Strahleninduktion von apoptotischen und nekrotischen Lymphozyten im Annexin V-Assay.**

Gezeigt wird auf die Aufteilung der Zellen in normale (grau), apoptotische (grün) und nekrotische (rot) Zellen

**A:** in unbestrahltem Zustand (0 Gy) sowie

**B:** nach Bestrahlung (x Gy).

Schwarz dargestellt sind die Anfangs- und Endraten des jeweiligen Zustandes, diese Werte werden über die gemessenen Frequenzen, d. h. die relativen Anteile der normalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen in der Zellpopulation vor (0 Gy) bzw. nach der Bestrahlung (x Gy), geschätzt und sind folglich bekannt. In blau abgebildet sind die Übergangswahrscheinlichkeiten von einem Zustand in den nächsten.

Da jede gemessene Zelle vor Bestrahlung entweder im normalen, apoptotischen oder nekrotischen Zustand vorliegt, ist die Summe der einzelnen Zustandswahrscheinlichkeiten gleich eins.

$$P_{nor,0} + P_{apo,0} + P_{nek,0} = 1$$

Zum Zeitpunkt nach Bestrahlung liegen die Zellen gleichermaßen im Zustand „normal“, „apoptotisch“ oder „nekrotisch“ vor, die jeweiligen Zustandswahrscheinlichkeiten addieren sich auch hier zu eins.

$$P_{nor} + P_{apo} + P_{nek} = 1$$

Das gleiche gilt für die Übergangswahrscheinlichkeiten, die von einem der Zustände ausgehen, auch sie addieren sich zu eins. Die Ausgangs- und Endwahrscheinlichkeiten für die einzelnen Zustände sind bekannt, nämlich die gemessenen Anteile normaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen an den Gesamtzellen vor bzw. nach Bestrahlung.

Die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Zustand nach Bestrahlung zu erhalten, ergibt sich aus der Summe der Wahrscheinlichkeiten von allen drei möglichen Ausgangszuständen, in den bestimmten Zustand nach Bestrahlung zu gelangen. Dabei bestimmt die

Induktionswahrscheinlichkeit die Wahrscheinlichkeit einer Zelle, von einem Zustand vor der Bestrahlung in einen Zustand nach der Bestrahlung zu gelangen. Es gilt also:

$$\begin{aligned}
 1. P_{\text{nor}}: \quad & P_{\text{nor}} = P_{\text{nor},0} \cdot (1 - P_{\text{apo,ind.}} - P_{\text{nek,ind.}}) \\
 2. P_{\text{apo}}: \quad & P_{\text{apo}} = P_{\text{nor},0} \cdot P_{\text{apo,ind.}} + P_{\text{apo},0} \cdot (1 - P_{\text{nek,ind.}}) \\
 3. P_{\text{nek}}: \quad & P_{\text{nek}} = P_{\text{nor},0} \cdot P_{\text{nek,ind.}} + P_{\text{apo},0} \cdot P_{\text{nek,ind.}} + P_{\text{nek},0} \cdot 1
 \end{aligned}$$

Die Gleichungen 1., 2. und 3. basieren auf der Vereinfachung, dass normale und apoptotische Zellen die gleiche Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{\text{nek, ind.}}$  zeigen, in Nekrose zu gehen, da das Gleichungssystem ohne diese Annahme nicht lösbar ist.

Durch Umformung erhält man die anfangs angegebenen Gleichungen, durch die die Induktionswahrscheinlichkeiten ausgedrückt werden können:

$$P_{\text{nek,ind.}} = \frac{P_{\text{nek}} - P_{\text{nek},0}}{1 - P_{\text{nek},0}} \quad \text{und} \quad P_{\text{apo,ind.}} = \frac{P_{\text{apo}} - P_{\text{apo},0} \cdot (1 - P_{\text{nek,ind.}})}{1 - P_{\text{apo},0} - P_{\text{nek},0}}$$

In Tabelle 13 im Anhang sind die ermittelten Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{\text{apo, ind.}}$  in Prozent dargestellt, die die Kontrolle SM in den wiederholten Experimenten zeigt.

Um zu überprüfen, ob in den interexperimentellen Schwankungen Korrelationen mit den für die Proben gewonnenen Werten auftreten, wurde ein Spearman'scher Rangkorrelationstest verwendet. Rangtests sind im Allgemeinen unabhängig von Einzelwerten („Ausreißern“) (Sachs und Hedderich, 2006). Im Falle von signifikanten Korrelationen zwischen den Werten der für einen Versuchsansatz individuellen Probe der Standardkontrolle SM mit den jeweiligen Werten der Patienten- und Probandenproben desselben Experiments wurde für das betreffende Sub-Kollektiv mit einer linearen Regression der Proben auf die Standardkontrolle SM eine Normierung durchgeführt. Die Testgruppenwerte wurden mit den jeweiligen linearen Trendkoeffizienten mit der folgenden Formel korrigiert:

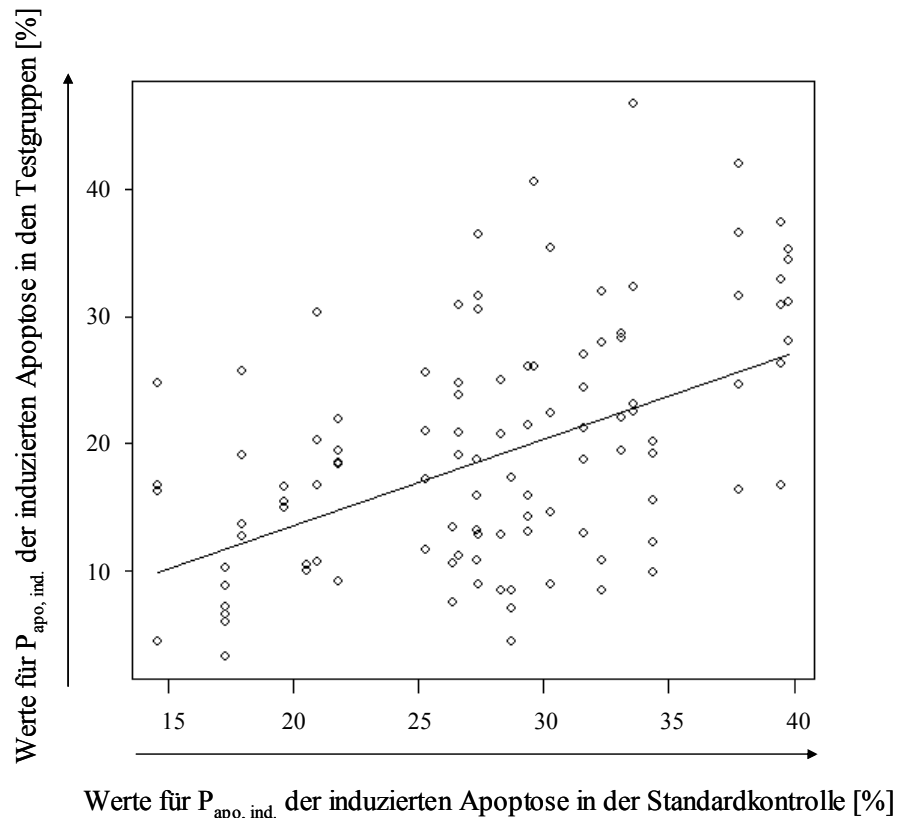
$$A_{\text{korrigiert}} = A_{\text{unkorrigiert}} - c - aA + \text{Mittelwert}(A_{\text{unkorrigiert}}),$$

wobei  $a$  die lineare Zunahme beschreibt und  $c$  die Achsenabschnittskonstante (Abbildung 30). Die Variable  $A$  steht für die erhaltenen Werte der induzierten Apoptose in den einzelnen Testgruppen, der Mittelwert der Werte für die unkorrigierten Proben wurde wieder dazu addiert.



Die so auf den Wert der für einen Versuchsansatz individuellen Probe der Standardkontrolle SM korrigierten Werte für induzierte Apoptose in den KORA-Proben sind (in Prozent) in Tabelle 14 im Anhang angegeben.

Für die Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$ , die in den Proben des LUCY-Kollektivs gefunden wurden, gilt entsprechend Tabelle 15 im Anhang.

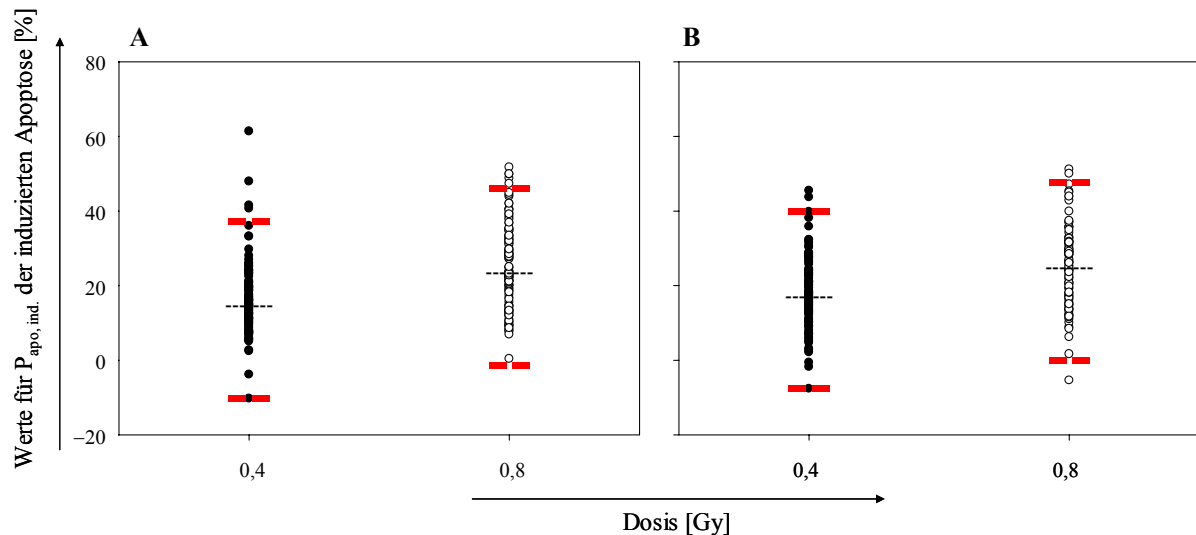


**Abbildung 30: Feststellen einer Korrelation der Werte für  $P_{apo, ind.}$  in den Testgruppen mit den Werten der Standardkontrolle am Beispiel der Dosis von 0,8 Gy in der Auswertegruppe 2.**

Die Werte für die induzierte Apoptose in den Testgruppen, in der Berechnung als A bezeichnet, wurde auf der Ordinate aufgetragen, die Werte für die Standardkontrolle, als K bezeichnet, auf der Abszisse. Die eingezeichnete Gerade ist die Trendlinie. Die Steigung dieser Geraden beträgt  $A = 0,68 \cdot K$ .

Die Daten konnten zusammengefasst und als *Dot Blot* dargestellt werden (Abbildung 31). Auf der Ordinate ist der (sofern nötig) korrigierte Wert der Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{apo, ind.}$  der induzierten Apoptose in Prozent aufgetragen, auf der Abszisse die Dosis, mit der bestrahlt wird. Wie zu erwarten war, lagen die Werte für induzierte Apoptose nach Bestrahlung mit 0,8 Gy in beiden Versuchsgruppen höher als nach Bestrahlung mit 0,4 Gy. Beide Kohorten zeigten größere Streuung der Werte als die rot eingezeichnete Schwankung der Standardkontrolle SM. Die Werte, die für das KORA-Kollektiv gewonnen wurden (Abbildung 31A), zeigten eine größere Streuung als die Werte, die für die LUCY-Kohorte

vorlagen (Abbildung 31B). Die ermittelten Werte des Medians für die Proben des KORA-Kollektivs liegen mit 14,9% nach Behandlung mit 0,4 Gy und 23,6% nach Behandlung mit 0,8 Gy etwas niedriger als die entsprechenden Werte, die für das LUCY-Kollektiv ermittelt werden konnten mit 17,4% nach Behandlung mit 0,4 Gy und 25,1% nach Behandlung mit 0,8 Gy.



**Abbildung 31: Graphische Darstellung der Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{apo, ind.}$  der induzierten Apoptose nach ionisierender Bestrahlung der Proben mit 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy als *Dot Blot*.**

Ausgefüllte Punkte symbolisieren jeweils einen Wert nach Bestrahlung mit 0,4 Gy, leere Kreise Werte, die nach Bestrahlung mit 0,8 Gy gewonnen wurden. Rot eingezeichnet ist die Schwankungsbreite der SM Kontrolle um den Mittelwert der Patientenproben.

**A:** Werte für  $P_{apo, ind.}$  in den KORA-Proben. Bei einer 0,8 Gy Bestrahlung lag der Mittelwert wie erwartet etwas höher als bei 0,4 Gy.

**B:** Werte für  $P_{apo, ind.}$  in den LUCY-Proben. Ebenfalls lag der Mittelwert nach 0,8 Gy höher als nach 0,4 Gy Bestrahlung.

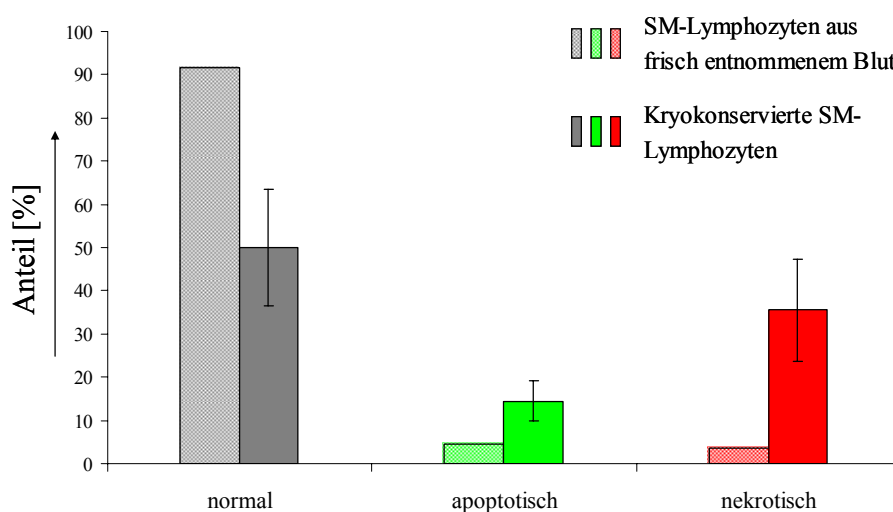
Generell war zu bemerken, dass für die Proben des KORA-Kollektivs eine höhere Schwankung vorlag als für die Proben der LUCY-Kohorte. Die erhaltenen Negativwerte für einige der Proben sind durch die statistischen Korrekturen bedingt.

Anhand dieser ermittelten Werte sollten Proben ausgewählt werden, für die lymphoblastoide Zelllinien zur weiteren Untersuchung bezüglich der Apoptose hergestellt werden sollten.

#### 4.2.1.2 Vergleich von frisch isolierten Lymphozyten und kryokonservierten Lymphozyten im Annexin V-Assay

Der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen vor Bestrahlung war ein Wert, der zwischen den einzelnen Proben großen Schwankungen unterlag und für einige Proben sogar Werte nahe 100% zeigte. Da in dieser nekrotischen Population keine Apoptose induzierbar war, konnten diese Proben in der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

Um zu eruieren, wodurch der hohe Anteil an nekrotischen Zellen ausgelöst wurde, wurden Lymphozyten aus einer frischen Blutprobe der Kontrollperson SM isoliert, für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und einem Annexin V-Assay unterzogen. Durch diesen Ansatz sollte geklärt werden, ob die auftretende erhöhte Nekrose durch die Kryokonservierung der Lymphozyten in flüssigem Stickstoff verursacht wurde. Tatsächlich wiesen die frischen Lymphozyten einen sehr geringen Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen auf (Abbildung 32), mehr als 90% der Zellen waren in normalem Zustand, 4,5% zeigten Apoptose und nur 3,5% befanden sich in Nekrose.



**Abbildung 32: Vergleich zwischen frisch isolierten und kryokonservierten Lymphozyten im Annexin V-Assay.**

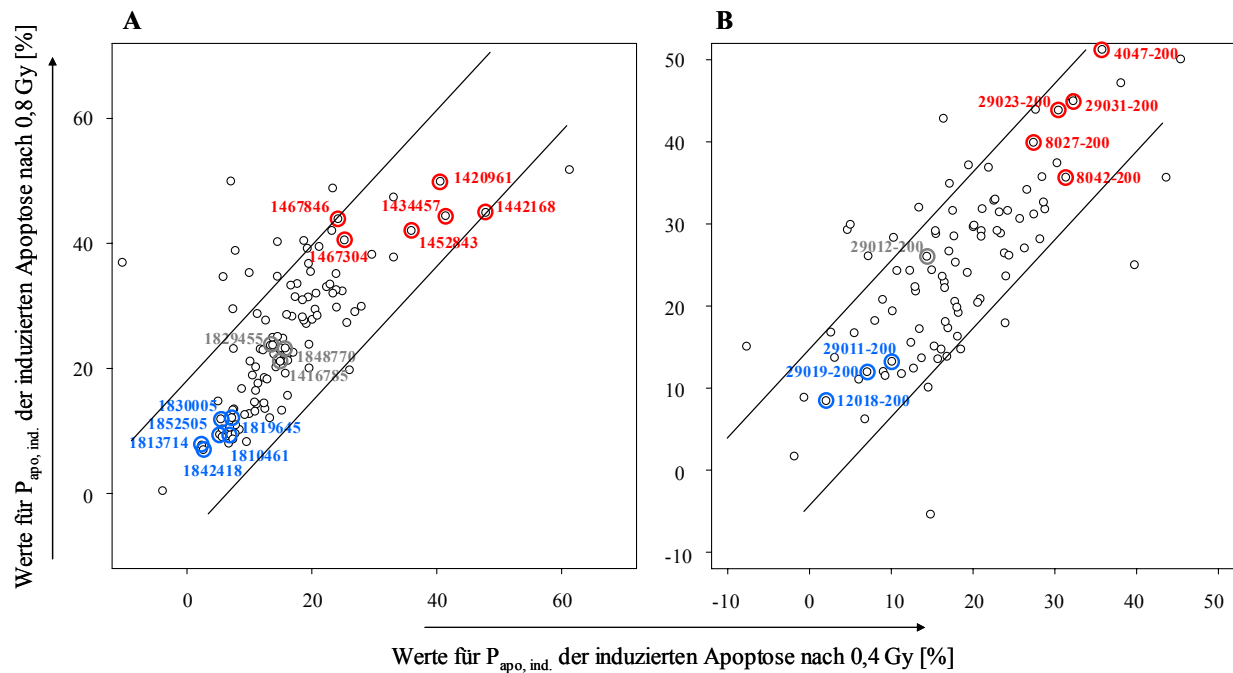
Die initiale Verteilung normaler (grau), apoptotischer (grün) und nekrotischer (rot) Lymphozyten wurde zwischen frisch isolierten Lymphozyten (helle Farben) und kryokonservierten Lymphozyten (dunkle Farben) derselben Spenderperson verglichen. Gezeigt wird, dass Lymphozyten aus frisch entnommenem Blut zu mehr als 90% in normalem Zustand vorlagen und nur sehr geringe Apoptose- und Nekroseraten zeigten, während Proben kryokonservierter Lymphozyten derselben Spenderperson im Durchschnitt 50% normale Zellen und 35% nekrotische Zellen aufwiesen. Die Raten für kryokonservierte Zellen wurden in 23 unabhängigen Experimenten erhoben, die Werte für frisch isolierte Lymphozyten stammen aus einem Experiment.

Im Gegensatz dazu zeigten die Lymphozyten, die in Stickstoff gelagert wurden, im Durchschnitt nur einen Anteil von 50% an normalen Zellen. Dieser Wert ist der Mittelwert aus 23 unabhängigen Experimenten, die Werte der Einzelexperimente bewegten sich zwischen 10% und 72% der Zellen. Der Anteil apoptotischer Zellen lag in den einzelnen Experimenten zwischen 4% und 23%, im Durchschnitt waren es 14%. Entsprechend war der Anteil nekrotischer Zellen im Durchschnitt mit 35% relativ hoch, die Extremwerte lagen hier bei 15% und 66%. Die erhöhten Anteile nekrotischer Zellen, die in einigen der Patientenproben unabhängig von der Bestrahlung auftraten, basieren entsprechend auf Schädigungen durch die Kryokonservierung der Proben und nicht auf der Erkrankung des Patienten. Proben, die Nekroseanteile von mehr als 80% der Zellen bereits vor Bestrahlung aufwiesen, wurden daher in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

#### **4.2.1.3 Auswahl der im Annexin V-Assay getesteten Proben für eine EBV-vermittelte Immortalisierung**

Im Anschluss an den Annexin V-Assay sollten die Proben weiter bezüglich Apoptose untersucht werden. Zunächst sollten die Ergebnisse in weiteren quantitativen Analysen verifiziert werden. Da die Verfügbarkeit von Patientenlymphozyten stark limitiert ist, sollten die folgenden Versuche an Zelllinien, die aus einigen der untersuchten Proben gewonnen werden, durchgeführt werden. Die Auswahl der Proben für die Immortalisierung erfolgte mit Hilfe der Resultate des Annexin V-Assays. Ca. 5% der Proben, die übereinstimmend nach ionisierender Bestrahlung mit 0,4 Gy und mit 0,8 Gy überdurchschnittliche oder unterdurchschnittliche Anteile an Zellen mit induzierter Apoptose zeigten, sowie einige Proben, die durchschnittliche induzierte Apoptoseraten zeigten, wurden ausgewählt (Abbildung 33).

Im Diagramm wurden die Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  nach Bestrahlung mit 0,4 Gy gegen die Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  nach Bestrahlung mit 0,8 Gy aufgetragen. Proben, die übereinstimmende Tendenz der Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  nach beiden Dosen zeigten, liegen hier in etwa in dem markierten Bereich zwischen den beiden diagonalen Linien. Proben, die von diesem Bereich abwichen, unterlagen vermutlich versuchsbedingten Schwankungen, da sie sehr unterschiedliche Werte für die Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  nach den getesteten Dosen zeigten. Für die Immortalisierung wurden Proben ausgewählt, die sich im Diagramm innerhalb der Markierung befanden.



**Abbildung 33: Auswahl der Proben für eine EBV-vermittelte Immortalisierung.**

Jeder Kreis symbolisiert eine Probe. Die Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  nach Bestrahlung mit 0,4 Gy (Abszisse) wird gegen die Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  nach Bestrahlung mit 0,8 Gy (Ordinate) aufgetragen.

**A:** Darstellung der Proben des KORA-Kollektivs.

**B:** Darstellung der Proben des LUCY-Kollektivs.

Die roten Kreise markieren ausgewählte Proben mit übereinstimmend überdurchschnittlichen Werten für  $P_{apo, ind.}$ , die grauen Kreise Proben mit durchschnittlichen Werten und die blauen Kreise Proben mit unterdurchschnittlichen Werten. Weitere Proben, die im obigen Diagramm geeignet erschienen, zeigten entweder Unstimmigkeiten in den Rohdaten, waren ungeeignet für die Immortalisierung oder es lagen keine Lymphozyten vor, die für die Immortalisierung verwendet werden konnten.

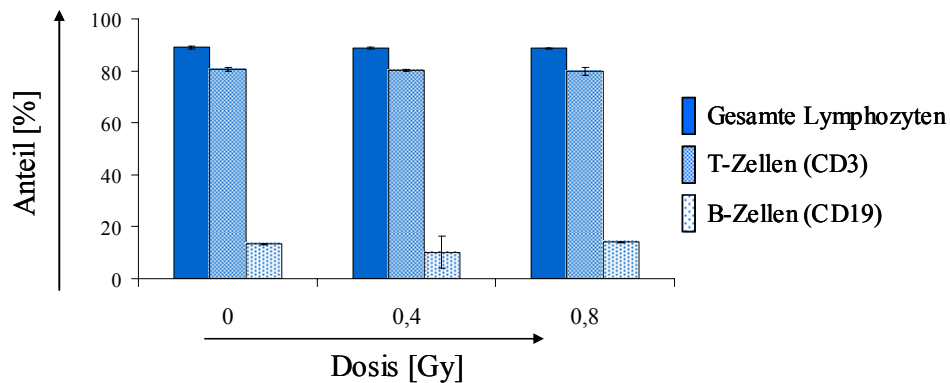
Rot markiert sind Proben mit übereinstimmend hohen Werten der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$ , blau diejenigen mit niedrigen Werten der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$ . Zusätzlich wurden in grau markiert Proben ausgewählt, die durchschnittliche Werten der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  zeigten. In Tabelle 16 im Anhang ist eine Liste der erzeugten Zelllinien sowie der Tendenz der Werte der Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind.}$  im Annexin V-Assay aufgeführt.

#### 4.2.1.4 Analyse der Verteilung von B- und T-Lymphozyten im Annexin V-Assay

Die Fragestellung nach dem jeweiligen Anteil von B- und T-Lymphozyten an den untersuchten Zellen ergab sich aus der Tatsache, dass im Folgenden mit EBV-immortalisierten LCL gearbeitet wurde. Durch die Immortalisierung mit Hilfe einer geeigneten EBV-Variante wurden in erster Linie B-Lymphozyten transformiert, nur in seltenen Fällen handelt es sich um T-Lymphozyten (Manor, 2008). Der Annexin V-Assay wurde undifferenziert an B- und T-Lymphozyten durchgeführt, da mit einer Mischung von

Antikörpern gegen CD3 und gegen CD19 gearbeitet wurde, die mit dem gleichen Farbstoff konjugiert sind. Um nun festzustellen, ob sich die Verteilung der normalen, apoptotischen und nekrotischen Fraktion zwischen B- und T-Lymphozyten unterscheidet, wurde der Versuch zweimal jeweils einzeln mit dem Antikörper gegen CD3 und gegen CD19 durchgeführt.

Die Auswertung des Versuchsansatzes ergab, dass 90% aller Zellen von den Antikörpern gegen CD3 und CD19 dekoriert waren, es handelte sich folglich um T- oder B-Zellen. Wurden selektiv Antikörper gegen CD3 eingesetzt, zeigten immerhin 80% aller Zellen ein Signal, bei Verwendung von Antikörpern gegen CD19 waren es nur noch ca. 11% aller Zellen. Werden die Anteile für B- und T-Lymphozyten auf die Lymphozyten insgesamt bezogen, errechnet sich eine Verteilung von 88% T-Lymphozyten und 12% B-Lymphozyten in den gesamten Lymphozyten (Abbildung 34).



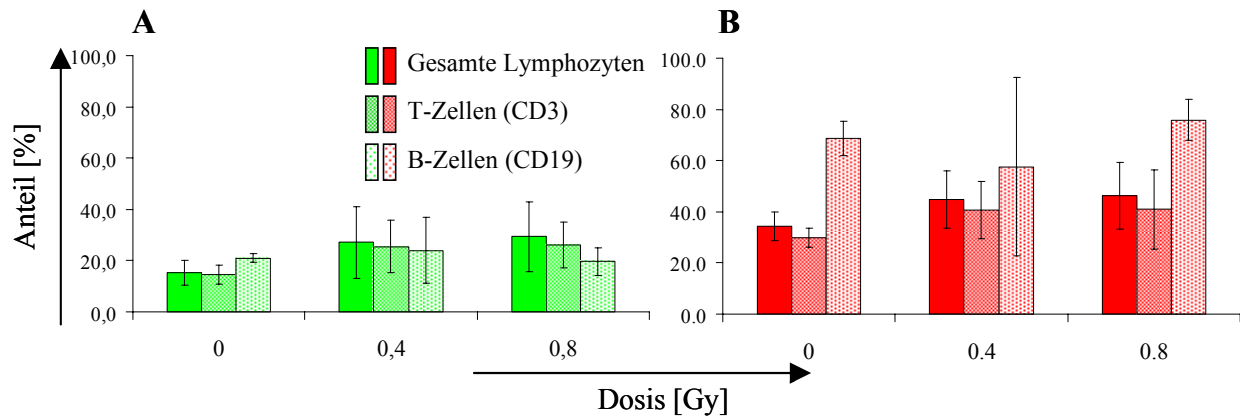
**Abbildung 34: Prozentualer Anteil von B- und T-Lymphozyten an den Gesamtzellen im Annexin V-Assay.**

Die Gesamtzellen werden in dunkelblau dargestellt, die T-Zellen in mittelblau und die B-Zellen in hellblau. Gezeigt wird, dass ca. 90% aller Zellen als Lymphozyten identifiziert werden können. Die T-Lymphozyten machten ungefähr 80% aller Signale aus, die B-Lymphozyten lediglich einen Anteil von etwa 11%. Hieraus errechnet sich, dass es sich bei ca. 88% aller gemessenen Lymphozyten um T-Lymphozyten handelte und nur etwa bei 12% um B-Lymphozyten.

Weiterführend konnte auch der prozentuale Anteil von B- und T-Lymphozyten an den einzelnen untersuchten Zellfraktionen (apoptotisch und nekrotisch) gemessen werden (Abbildung 35).

Es zeigte sich, dass die Anfangsraten für Apoptose für die drei untersuchten Lymphozytenpopulationen B- und T-Lymphozyten gemischt, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten ähnlich waren, auch die Endrate nach Bestrahlung mit 0,4 Gy und 0,8 Gy wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die Apoptoserate der unbehandelten Zellen bewegte sich in den drei Gruppen zwischen 15% und 21%, wobei der höchste Wert in der B-Zellpopulation auftrat. Wurde dagegen die Nekrose betrachtet, wiesen die untersuchten

B-Zellen mit einer Nekroserate von 58% bis 76% in der unbehandelten Probe gegenüber der Mischpopulation aus B- und T-Zellen sowie den T-Zellen mit einem Nekroseanteil von 30% - 46% eine nahezu doppelt so hohe Rate auf. Entsprechend gering war im Vergleich auch die Rate an normalen Zellen. Ein entsprechender Versuchsansatz mit einer Probe einer weiteren Spenderperson führte zu gleichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 35: Prozentualer Anteil von B- und T-Lymphozyten an der apoptotischen und der nekrotischen Fraktion im Annexin V-Assay.**

Die Gesamtlymphozyten werden in dunkelgrün und dunkelrot gezeigt, die T-Zellen in mittelgrün und mittelrot und die B-Zellen in hellgrün und hellrot. Die Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Zellpopulation.

**A:** Darstellung der Annexin V-positiven und PI-negativen Zellen (grün). Für die drei gemessenen Lymphozytenpopulationen (B- und T-Zellen, T-Zellen, B-Zellen) lagen in unbestrahltem Zustand Werte zwischen 15% und 21% der gemessenen Zellen vor, nach Bestrahlung erhöhte sich die Rate auf 20% bis 30%.

**B:** Darstellung der Annexin V-positiven und zugleich PI-positiven Zellen (rot). Für die T-Zellpopulation lag die Nekrose in unbestrahltem Zustand etwas unter der Nekrose der Gesamtlymphozyten (30% im Vergleich zu 34%). Betrachtet man die B-Zellen, sieht man bereits bei unbestrahlten Proben eine Nekroserate von 69%, die sich nach Bestrahlung lediglich um bis zu 7% - Punkte erhöhte. Im Gegensatz dazu stieg die Nekroserate in den T-Zellen um 11% - Punkte, in den Gesamtlymphozyten sogar um 12% - Punkte.

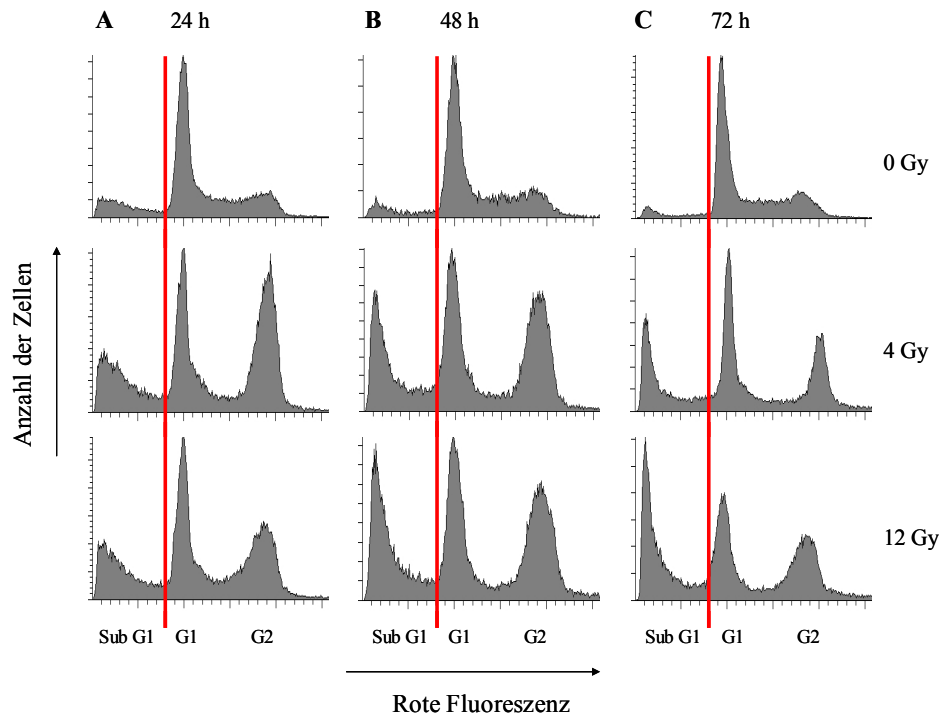
Es ist daher kaum möglich, in B-Zellen induzierte Apoptose zu messen, die in Tabelle 13, Tabelle 14 und Tabelle 15 angegebenen Daten für die Übergangswahrscheinlichkeit  $P_{apo, ind}$  beziehen sich also primär auf die T-Lymphozyten.

## 4.2.2 Analyse des Apoptoseverhaltens in lymphoblastoiden Zelllinien

### 4.2.2.1 Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1) in lymphoblastoiden Zelllinien

Eine Methode, Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien zu messen, besteht in der Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion. In diesem Versuch wurde die DNA der Zellen mittels PI angefärbt und anschließend eine Messung der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle im Durchflusszytometer durchgeführt. In einer unbehandelten Zellkultur von

lymphoblastoiden Zelllinien ergab es ein hohes Maximum für Zellen in der G1-Phase und ein kleineres bei doppelter Fluoreszenzintensität für Zellen in der G2-Phase (Abbildung 36, 0 Gy).



**Abbildung 36: Histogramme der Fluoreszenz von PI bei durchflusszytometrischen Messungen der Sub G1 Population.**

Die Messung erfolgte in unbehandelten Zellen der Kontrollzelllinie SiMo sowie nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 12 Gy für die Zeitwerte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung. In jedem Diagramm wurde die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Ordinate) gegen die rote Fluoreszenz von PI (Abszisse) aufgetragen.

**A:** Messung 24 h nach Bestrahlung.

**B:** Messung 48 h nach Bestrahlung.

**C:** Messung 72 h nach Bestrahlung.

In der ersten Zeile ist die unbehandelte Kontrolle dargestellt, in der zweiten die Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy, in der dritten die Probe nach Bestrahlung mit 12 Gy. Zu sehen ist zunächst in unbestrahlten Proben die Aufteilung der Zellen in eine G1-Population, eine G2-Population mit doppelter Fluoreszenzintensität von der G1-Population und eine kleine Sub G1-Population mit geringerer Fluoreszenzintensität. 24 h nach Bestrahlung stieg der Wert des Maximums für G2 auf der y-Koordinate drastisch an, dies beruht auf einem G2-Arrest der geschädigten Zellen. Im Bereich von Sub G1 erfolgte leichte Steigerung. Zu späteren Zeitwerten nach Bestrahlung schrumpfte die G2-Population, im Bereich Sub G1 trat eine weitere Zunahme ein. Die rot eingezeichneten Hilfslinien markieren die Grenze zwischen G1 und dem Sub G1-Bereich.

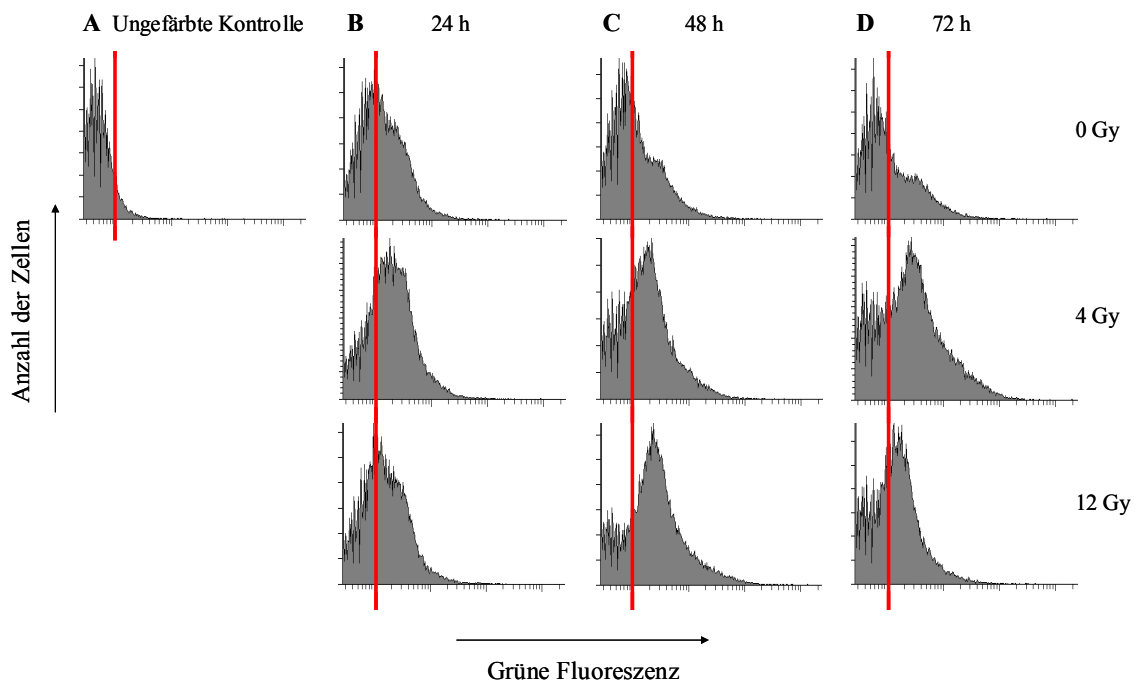
Nach ionisierender Bestrahlung der Zellen mit 4 Gy erhöhte sich zunächst die Anzahl der Zellen in G2 (G2-Arrest) und ein niedrigeres Maximum im Sub G1-Bereich entstand (Abbildung 36, 4 Gy, 24 h). Innerhalb von drei Tagen wurde die Zahl der Zellen in der G2-Phase etwas geringer, die Sub G1-Population wurde größer (Abbildung 36, 4 Gy, 48 h, 72 h). Nach Bestrahlung mit 12 Gy zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei der G2-Arrest nicht so deutlich sichtbar war (Abbildung 36, 12 Gy).



Für die statistische Auswertung wurde für jede Zelllinie, jede Dosis und jeden Zeitpunkt der prozentuale Anteil der gemessenen Zellen im Sub G1-Bereich erfasst. Der prozentuale Anteil toter Zellen in den unbehandelten Zellen wurde jeweils von dem entsprechenden Anteil nach Bestrahlung subtrahiert, um die induzierte Apoptoserate jeder Zelllinie in Prozent zu erhalten.

#### 4.2.2.2 Detektion von Caspasen durch einen Caspaseinhibitor in lymphoblastoiden Zelllinien

In intakten Zellen liegen Caspasen inaktiv vor (Chowdhury *et al.*, 2006). Um Apoptose zu initiieren, erfolgt eine Kaskade der Aktivierung von Caspasen. Daher konnte der Nachweis von aktiven Caspasen als weiterer Indikator für Apoptose herangezogen werden.



**Abbildung 37: Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der Fluoreszenzintensität von Lymphozyten nach Behandlung mit dem fluoreszenzmarkierten Caspaseinhibitor FITC-VAD-FMK.**

Die Messung erfolgte in unbehandelten Zellen der Kontrollzelllinie SiMo sowie nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 12 Gy für die Zeitwerte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung. In jedem Diagramm wurde die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Ordinate) gegen die grüne Fluoreszenz von FITC (Abszisse) aufgetragen.

**A:** Eine ungefärbte Kontrollprobe, durch die die Autofluoreszenz der Zellen festgestellt werden kann.

**B:** Messung 24 h nach Bestrahlung.

**C:** Messung 48 h nach Bestrahlung.

**D:** Messung 72 h nach Bestrahlung.

In der ersten Zeile ist die unbehandelte Kontrolle dargestellt, in der zweiten die Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy, in der dritten die Probe nach Bestrahlung mit 12 Gy. Zu sehen ist ein Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Dosis, jedoch kein Anstieg im Verlauf der Zeit. Die rot eingezeichneten Hilfslinien dienen der Orientierung.

Dies geschah mit Hilfe eines FITC-markierten Caspaseinhibitors, der an das aktive Zentrum von Caspasen bindet. Im Durchflusszytometer konnte die Zunahme der Intensität der grünen Fluoreszenz nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen gemessen werden (Abbildung 37).

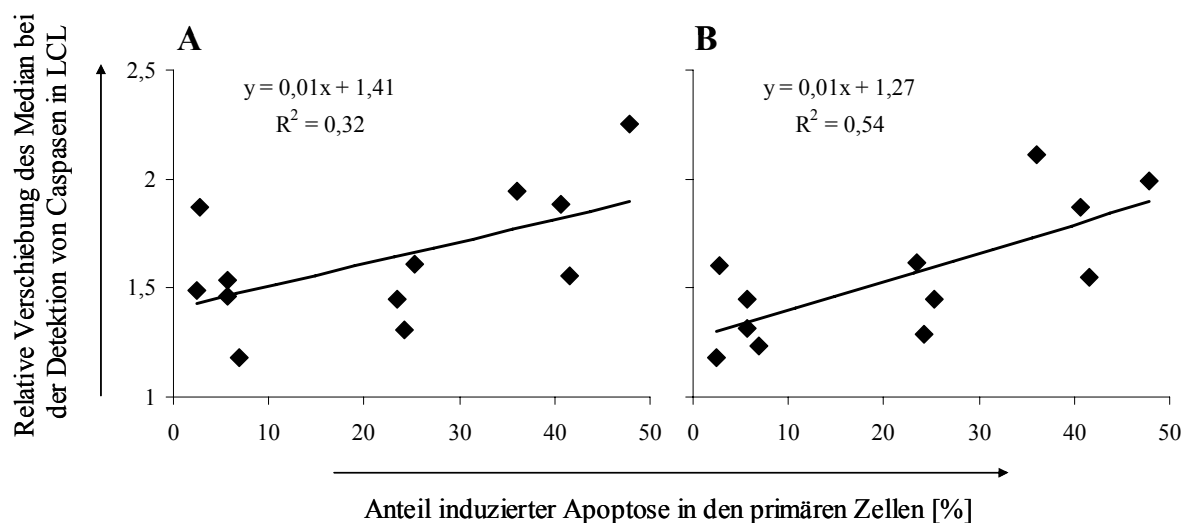
Direkt erkennbar ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität der Population nach Bestrahlung, jedoch nicht mit steigender Inkubationsdauer nach Bestrahlung. Für die Auswertung wird der Median der Verteilung für jede Probe ermittelt. Um den Anstieg der Caspaseaktivität zu ermitteln, wurden die in den bestrahlten Proben erhaltenen Werte für den Median auf den jeweiligen Median der unbehandelten Probe normalisiert. Damit wurde die relative Verschiebung des Medians bezogen auf den Median der in unbehandelten Zellen vorliegenden Caspaseaktivität berechnet, die in der statistischen Auswertung herangezogen wurde.

#### **4.2.2.3 Vergleichende Analyse der Apoptoseraten in primären Lymphozyten und korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien**

Die Messungen der Apoptoseraten in lymphoblastoiden Zelllinien mittels Nachweis der hypodiploiden Zellfraktion und mit Hilfe eines Caspaseinhibitors erfolgte in den Zelllinien generiert aus Zellen der LUCY-Kohorte in jeweils ein bis fünf Versuchen für vier Zelllinien, deren korrespondierende primären Lymphozyten im Annexin V-Assay auffällig hohe Apoptoseraten gezeigt hatten (4047-200, 29031-200, 8042-200, 8027-200), für drei Zelllinien, deren korrespondierende primären Lymphozyten im Annexin V-Assay auffällig niedrige Apoptoseraten gezeigt hatten (12018-200, 29019-200, 29011-200) und einer Zelllinie mit durchschnittlicher Apoptoserate der korrespondierenden primären Lymphozyten (29012-200). Die gewählten Parameter waren die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy. Für das KORA-Kollektiv wurden sechs Zelllinien mit hoher Apoptoserate in den korrespondierenden primären Lymphozyten (1467304, 1420961, 1442168, 1434457, 1467846, 1452843) und fünf Zelllinien mit niedriger Apoptoserate in den korrespondierenden primären Lymphozyten (1819645, 1830005, 1852505, 1813714, 1842418) ausgewählt. Die Versuche erfolgten in den KORA-Zelllinien jeweils in zwei Wiederholungen für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit den Dosen 4 Gy und 12 Gy.

Um die für die Zelllinien erhobenen Daten mit den Daten für die primären Zellen aus dem Annexin V-Assay zu korrelieren, wurden Diagramme erstellt, in denen jeweils auf der Abszisse für jede Probe der Anteil an induzierten apoptotischen Zellen im Annexin V-Assay

aufgetragen wurden. Auf der Ordinate wurden dann entsprechend für die korrespondierende Zelllinie der ermittelte Wert der Messung der hypodiploiden Zellfraktion bzw. der Detektion von Caspasen durch Nachweis eines Caspaseinhibitors aufgetragen. In Abbildung 38 sind exemplarisch die Diagramme für den Vergleich zwischen den Ergebnissen für die Messungen im Annexin V-Assay in den primären Lymphozyten nach einer Behandlung mit 0,4 Gy mit den Ergebnissen der Detektion von Caspasen in den entsprechenden Zelllinien zum Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy (Abbildung 38A) bzw. 12 Gy (Abbildung 38B) in den Proben des KORA-Kollektivs dargestellt.



**Abbildung 38: Vergleich der induzierten Apoptose in primären Lymphozyten aus dem KORA-Kollektiv und ihren korrespondierenden Zelllinien.**

Auf der Abszisse ist der Anteil induzierter Apoptose in den primären Lymphozyten (in Prozent) nach Bestrahlung mit 0,4 Gy aufgetragen. Die Ordinate repräsentiert die relative Verschiebung des Medians in der Detektion von Caspasen in den korrespondierenden Zelllinien. Jeder Wert entspricht also einem Probenpaar. Die durchgezogene Linie stellt jeweils die Trendlinie der Werte dar. Für diese Gerade kann die Gleichung ( $y = m \cdot x + t$ ) bestimmt werden und damit die Steigung  $m$  dieser Gerade. Außerdem kann das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Korrelation sowie die Art der Korrelation ermittelt werden.

**A:** Auf der Ordinate sind die Werte der Medianverschiebung für den Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy aufgetragen. Die Steigung der Trendlinie beträgt  $m = 0,01$ , das Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,32$ , die Korrelation ist positiv.

**B:** Auf der Ordinate sind die Werte der Medianverschiebung für den Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit 12 Gy aufgetragen. Die Steigung der Trendlinie beträgt  $m = 0,01$ , das Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,54$ , die Korrelation ist positiv.

Durch die aufgetragenen Werte konnte eine Trendlinie gezogen werden, die durch die Geradengleichung  $y = m \cdot x + t$  beschrieben werden kann. Außerdem kann für jeden Vergleich das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  bestimmt werden. Es gibt an, in welchem Maß die Varianz einer Variablen durch die Varianz einer anderen Variablen bestimmt wird. Ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0$  bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen besteht, ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 1$  sagt aus, dass ein exakter linearer Zusammenhang zwischen

zwei Datensätzen besteht, also eine Korrelation von 100%. Ein weiterer wichtiger Parameter für den Vergleich von zwei Datensätzen ist die Art der Korrelation. Eine positive Korrelation bedeutet, dass die Zelllinien, die aus primären Zellen mit erhöhter strahleninduzierter Apoptose generiert worden sind, ebenfalls erhöhte Apoptose nach Bestrahlung aufwiesen, während eine negative Korrelation anzeigt, dass die aus primären Zellen mit erhöhter strahleninduzierter Apoptose hergestellten Linien gesenkte Apoptoseraten zeigen.

Der Vergleich zwischen jeweils zwei Parametern, im Beispiel die Anteile induzierter Apoptose in den primären Lymphozyten nach Bestrahlung mit 0,4 Gy und die relative Verschiebung des Medians in der Detektion der Caspasen 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy (Abbildung 38A) und mit 12 Gy (Abbildung 38B), wurde für alle möglichen Parameter-Paarungen durchgeführt, die Werte für das Bestimmtheitsmaß sowie die Art der Korrelation sind für die Proben des KORA-Kollektivs in Tabelle 17, für die Proben der LUCY-Kohorte in Tabelle 178 im Anhang zusammengefasst.

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ermöglicht eine Aussage darüber, ob ein exakter linearer Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen besteht. Ein Bestimmtheitsmaß  $R^2 < 0,5$  bedeutet, dass keine Korrelation vorliegt, ein Bestimmtheitsmaß  $0,5 < R^2 < 0,7$  bedeutet eine leichte Korrelation der Datensätze. Die Werte des Bestimmtheitsmaßes waren nur im Vergleich des Annexin V-Assays nach Bestrahlung mit 0,4 Gy mit der Detektion von Caspasen 72 h nach Bestrahlung größer als 0,5, nämlich  $R^2 = 0,54$ . In diesem speziellen Fall handelt es sich um eine leichte Korrelation, für alle anderen Paarungen von Datensätzen kann kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. In sämtlichen Vergleichen zwischen Datensätzen des LUCY-Kollektivs konnte lediglich ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 < 0,5$  festgestellt werden, ein linearer Zusammenhang konnte also ausgeschlossen werden.

## 5 Diskussion

Die Strahlenempfindlichkeit des Menschen unterliegt großen individuellen Unterschieden (Bentzen, 2006), deren Ursachen genetischer oder epigenetischer Natur sein können (Andreassen *et al.*, 2002). Beispiele für bekannte genetische Faktoren, die die Strahlenempfindlichkeit beeinflussen können, sind Veränderungen in den Genen *NBS1* (Tauchi 2000), *ATM* (Taylor *et al.*, 2004) und in den Genen der *XP*-Gruppe (Kraemer *et al.*, 2007). Sie verursachen Syndrome, deren Patienten an erhöhter Strahlenempfindlichkeit leiden, wie beispielsweise *Nijmegen Breakage Syndrom* (Tauchi 2000), *Ataxia telangiectasia* (Taylor, Groom *et al.* 2004) und *Xeroderma pigmentosum* (Kraemer *et al.*, 2007).

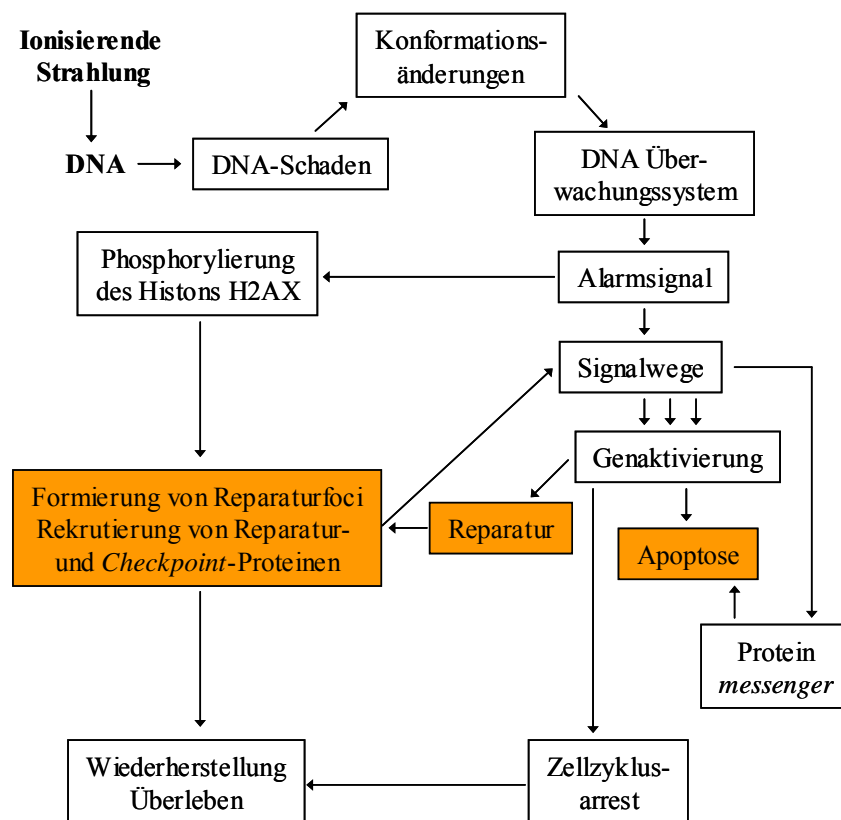
In Patienten, die an einem dieser Syndrome leiden, können Zusammenhänge zwischen hohem Krebsrisiko und Überempfindlichkeit gegenüber genotoxischen Faktoren wie UV- oder ionisierender Strahlung festgestellt werden. Gemeinsam ist diesen Störungen, dass sie durch Defekte in DNA-Reparaturprozessen charakterisiert sind (Pichierri *et al.*, 2000).

Außer diesen bekannten Proteinen, die an der komplexen Strahlenantwort von Zellen beteiligt sind, gibt es auch weitere Faktoren der zellulären Reaktion auf Strahlung, die die Strahlenempfindlichkeit beeinflussen. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen erhöhter zellulärer Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Noxen wie Strahlung und Krebsrisiko liegt es nahe, für Krebspatienten eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit bzw. Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Noxen zu postulieren (De Ruyck *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten dementsprechend Lymphozyten eines Kollektivs von jungen Lungenkrebspatienten (LUCY) mit Lymphozyten, die aus einem Kontroll-Kollektiv gesunder Spender (KORA) (Löwel *et al.*, 2005) gewonnen wurden, unter Zuhilfenahme mehrerer unabhängiger Verfahren auf zellbiologischer Ebene bezüglich ihrer Strahlenempfindlichkeit untersucht werden. Als Endpunkte dieser Analysen wurden die DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSB, *single strand break*) und die Apoptose nach Behandlung mit ionisierender Strahlung gewählt. Die SSB-Reparatur wurde ausgewählt, weil sich die Analyse der SSB-Reparatur mittels alkalischem *Comet Assay* bereits in einigen früheren Studien als geeigneter *Assay* zum Vergleich der Strahlenempfindlichkeit in isolierten Lymphozyten zwischen Kohorten von Krebspatienten und Kontroll-Kollektiven erwiesen hat (Saha *et al.*, 2008; Shahidi *et al.*, 2007; Palyvoda *et al.*, 2003). Die Analyse der SSB-Reparatur erfolgte in isolierten Lymphozyten der Spender mit Hilfe des alkalischen *Comet*

*Assays.* Des Weiteren wurde die SSB-Reparatur in lymphoblastoiden Zelllinien durch Quantifizierung von  $\text{NAD}^+$  in Zellextrakten und vergleichende Quantifizierung von Basenexzisionsreparaturprodukten (BER-Produkten) analysiert. Die gewählten lymphoblastoiden Zelllinien wurden aus Lymphozyten von Spendern mit bekanntem Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His hergestellt. Das *XRCC1*-Genprodukt spielt eine wichtige Rolle in der BER und damit auch in der Reparatur von SSB (Brem und Hall, 2005) und stellte somit ein geeignetes Ziel der Analysen dar.

Apoptose und DNA-Reparatur sind durch verschiedene Signalwege eng miteinander verknüpft (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Schematische Übersicht über die Reaktionen auf ionisierende Strahlung in einer Zelle.**

(Vereinfacht nach Szumiel, 2008). Ionisierende Strahlung kann zu verschiedenen Schädigungen in der DNA führen, die von einer Vielzahl von Proteinen, die an der Schadensstelle akkumulieren, erkannt werden. Durch diesen Vorgang wird die Proteinkinase Atm aktiviert, die durch Phosphorylierung verschiedener Proteine, darunter auch Nbs1, p53 und Chk1 und Chk2, zu deren Aktivierung führt und so das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben, Zellzyklusarrest oder Zelltod regulieren kann.

Tritt beispielsweise durch ionisierende Strahlung eine Schädigung der DNA auf, führt dies im Bereich der DNA-Schäden zur Akkumulation verschiedener Proteine, die diese Schäden erkennen und die Aktivierung der Proteinkinase Atm bewirken können. Durch diese Kinase werden verschiedene Effektorproteine, darunter Nbs1, p53 und die *Checkpoint*-Kinasen Chk1

und Chk2, phosphoryliert und so der Signaltransduktionsvorgang aktiviert. Je nach aktivierten Proteinen kann die Signalweiterleitung Zellüberleben, Zellzyklusarrest oder Zelltod bewirken (Szumiel, 2008).

Nicht erfolgte oder nicht erfolgreiche Reparatur von DNA-Schäden kann zur Apoptose einer Zelle führen (Szumiel, 2008). Daher ist die Apoptose ein interessanter Endpunkt für die Analyse der Strahlenempfindlichkeit. Zudem stellt die Apoptoseinduktion ein Ziel für die therapeutische Bestrahlung in der Tumorthherapie dar, da durch die Bestrahlung der Zelltod in Tumorzellen induziert werden soll (Fulda und Debatin, 2004; Debatin und Krammer, 2004).

## **5.1 Analysen zur DNA-Einzelstrangbruchreparatur**

### **5.1.1 Alkalischer Comet Assay**

Die Analyse der SSB-Reparatur erfolgte mit Hilfe des alkalischen *Comet Assays*. Der alkalische *Comet Assay* ist in der Literatur vielfach beschrieben (Trzeciak *et al.*, 2008; Gaivão *et al.*, 2007; Møller, 2005; Schmezer *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 1988; Ostling und Johanson, 1984), und er ist ein anerkanntes Verfahren, die DNA-Reparaturkapazität in Zellen zu bestimmen.

#### **5.1.1.1 Alkalischer Comet Assay: Betrachtung der Basalschäden**

In Proben von Personen, die eine ineffiziente SSB-Reparatur zeigen, ist neben verlangsamter Reparatur von strahleninduzierten Schäden zu erwarten, dass bereits die Hintergrundschäden, die in unbehandelten Zellen vorliegen, zahlreicher sind als in Kontrollproben von Personen mit normaler Reparaturreffizienz. Dies beruht darauf, dass in Zellen von empfindlichen Personen bereits die Reparatur der natürlich entstehenden DNA-Schäden geschwächt sein kann. Daher erfolgte der Vergleich von Proben eines Kollektivs junger Lungenkrebspatienten mit Proben einer Kohorte gesunder Spender im alkalischen *Comet Assay* zunächst durch Betrachtung der Basalschäden, die in unbehandelten Proben der Kollektive vorliegen. Hier konnte in allen Auswertungsgruppen festgestellt werden, dass sowohl in der Auswertung mit Hilfe der Medianwerte des TOMs als auch mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif in den Proben des LUCY-Kollektivs um den Faktor 1,1 bis 1,3 höhere Werte vorlagen als in den Kontrollproben des KORA-Kollektivs (siehe Abbildung 17, Kapitel 4.1.1.2 und Abbildung 19, Kapitel 4.1.1.3). Dieser Befund stimmt sehr gut mit den Ergebnissen überein, die an Proben von Brustkrebspatientinnen (Shahidi *et al.*, 2007), Patienten mit multiplen Tumoren

(Müller-Vogt *et al.*, 2003), Patienten mit Tumoren im Hals - Kopf - Bereich (Palyvoda *et al.*, 2003), Patienten mit Blasenkarzinom (Schabath *et al.*, 2003) und Lungenkrebspatienten ohne Einschränkung des Alters (Lou *et al.*, 2007) nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung gewonnen wurden. Für alle untersuchten Proben-Kollektive von Patienten wurde eine höhere Menge an Hintergrundschäden festgestellt als im entsprechenden Proben-Kollektiv gesunder Kontrollpersonen. Die durch umweltbedingte Faktoren ausgelösten Schäden der DNA können in den Lymphozyten von Patienten mit erhöhter Empfindlichkeit für genotoxische Noxen mit geringerer Effizienz repariert werden als in Lymphozyten von Personen mit normaler Empfindlichkeit (Shahidi *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie, in der mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierte Proben eines Kollektivs von Lungenkrebspatienten mit ebenso vorbehandelten Proben eines Kontroll-Kollektivs bezüglich der SSB-Reparatur im alkalischen *Comet Assay* nach Behandlung mit Bleomycin, einem Strahlenmimetikum, verglichen wurden, kein Unterschied in den Basalschäden in den unbehandelten Proben festgestellt werden (Schmezer *et al.*, 2001). PHA stimuliert besonders die Teilung von T-Lymphozyten (Trzeciak *et al.*, 2008). Zudem weist die DNA-Reparatur eine zellzyklusabhängige Komponente auf (Fortini und Dogliotti, 2007), proliferierende Zellen weisen eine andere DNA-Reparaturkapazität (DRC, *DNA repair capacity*) auf als unstimulierte Zellen, die sich größtenteils in der G0-Phase befinden. Möglicherweise ist in stimulierten Kulturen die SSB-Reparatur der stimulierten T-Lymphozyten ausreichend induziert, um eventuell geringe Unterschiede in der DRC von Patienten- und Kontrollproben zu maskieren. Dieser Faktor stellt eine mögliche Erklärung für den übereinstimmenden Grad an Basalschäden in den von Schmezer (*et al.*, 2001) verglichenen Kohorten dar. Die in nicht stimulierten Lymphozyten der untersuchten Krebspatienten gefundene erhöhte Basalschädigung gegenüber Lymphozyten gesunder Spender ist möglicherweise einer aus einer Vielzahl von Gründen, die zu genetischer Instabilität in den Zellen dieser Patienten führen (Lou *et al.*, 2007).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass bereits die Basalschäden in unbehandelten Proben von jungen Lungenkrebspatienten im alkalischen *Comet Assay* höher liegen als die unter gleichen Bedingungen in Proben gesunder Kontrollpersonen ermittelten. Dies könnte ein Indikator für eine vorbestehende genetische Instabilität in den Patientenzellen sein, die auch die Krebsentstehung in diesen Personen begünstigt haben könnte.



### **5.1.1.2 Alkalischer *Comet Assay*: Betrachtung der strahleninduzierten Schäden**

Ein weiterer Faktor, der häufig in vergleichbaren Studien zur Analyse herangezogen wird, sind die induzierten Schäden (Shahidi *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2007; Schabath *et al.*, 2003). Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Menge der strahleninduzierten DNA-Schäden unmittelbar nach Bestrahlung mit 4 Gy in den beiden Kohorten verglichen. Hier ist festzustellen, dass in Auswertungsgruppe 1 für die Auswertung mit Hilfe des Medianwerts des TOM und mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif in den Kontrollen eine höhere Schadensinduktion vorliegt als in den Proben des Patienten-Kollektivs, während in Auswertungsgruppe 2 für beide Parameter eine erhöhte Schadensinduktion in dem Patienten-Kollektiv vorliegt (siehe Abbildung 16, Kapitel 4.1.1.2 und Abbildung 18, Kapitel 4.1.1.3). In Auswertungsgruppe 3 wurden ausschließlich Proben des KORA-Kollektivs analysiert, daher konnte hier der Vergleich zu identisch behandelten Patientenproben nicht getroffen werden. In der Literatur gibt es hierzu ebenso verschiedene Ergebnisse: in einer Studie, die an Brustkrebspatientinnen durchgeführt wurde, konnte kein Unterschied zwischen dem Patienten-Kollektiv und dem Kontroll-Kollektiv festgestellt werden (Shahidi *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie, die die Analyse von Lymphozyten eines Lungenkrebspatienten-Kollektivs ohne Einschränkung des Alters zum Ziel hatte (Lou *et al.*, 2007), sowie einer vergleichenden Studie über Blasenkarzinompatienten (Schabath *et al.*, 2003), wurde dagegen gezeigt, dass Proben des jeweiligen Patienten-Kollektivs gegenüber Proben des Kontroll-Kollektivs erhöhten strahleninduzierten Schaden aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit kann festgestellt werden, dass die Quantifizierung strahleninduzierter Schäden in verschiedenen Proben keinen Rückschluss auf die Effizienz der DNA-Reparatur der beiden untersuchten Kollektive zulässt. In allen Proben identischen Zelltyps, die unter gleichen Bedingungen analysiert wurden, entstand eine vergleichbare Menge von strahleninduzierten Schäden.

### **5.1.1.3 Alkalischer *Comet Assay*: Betrachtung der DNA-Reparaturkapazität**

Um die Effizienz der SSB-Reparatur von Proben im alkalischen *Comet Assay* zu vergleichen, bietet sich eine Analyse der DNA-Reparaturkapazität an. Die DNA-Reparaturkapazität ermöglicht die Analyse der bis zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  reparierten Schäden unter Berücksichtigung der Menge der Basalschäden und der induzierten Schäden. Daher wurden die Reparatureigenschaften der beiden Kollektive anhand der DRC verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die DRC zu verschiedenen Zeitpunkten ( $t = 15$  min,  $t = 60$  min)

nach ionisierender Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 4 Gy ermittelt. In der Auswertung mit Hilfe der Medianwerte des TOM und dem DNA-Gehalt im Schweiß zeigen die Proben der Standardkontrollzellen SM, des KORA-Kollektivs und der LUCY-Kohorte übereinstimmend nach einer Reparaturdauer von 15 min eine deutlich größere Streuung der Einzelwerte für die DRC als nach einer Reparaturdauer von 60 min. Die intraindividuelle Streuung, die anhand der Standardkontrolle SM ermittelt wurde, ist für beide Reparaturdauern in der DRC, die mit Hilfe des *Olive Tail Moments* ermittelt wurde, und der DRC, die aus den Werten des DNA-Gehalts im Schweiß berechnet wurde, geringer als die interindividuelle Streuung der Werte der beiden untersuchten Kollektive. Die interindividuelle Streuung für das KORA-Kollektiv liegt um den Faktor 1,3 bis 2 höher als die intraindividuelle Streuung der Kontrolle SM, die für das LUCY-Kollektiv sogar um den Faktor 1,5 bis 2,9 (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21, Kapitel 4.1.1.4). Die intraindividuelle Streuung wurde als Schwelle für die Auswahl von „Ausreißern“ in den beiden Kollektiven verwendet. Als „Ausreißer“ werden diejenigen Proben bezeichnet, die auffällige Werte in den für die DRC ermittelten Werten zeigten und für weitere Analysen ausgewählt werden sollten. Bereits bei einer Reparaturdauer von 15 min, jedoch deutlich stärker bei einer Reparaturdauer von 60 min, zeigten sich in den Werten für die Proben des LUCY-Kollektivs wesentlich mehr „Ausreißer“ als für die Proben des KORA-Kollektivs. Im LUCY-Kollektiv konnten 18 Proben identifiziert werden, die jeweils in mindestens einer Parameterkombination (Auswertung mit Hilfe des TOM bzw. des DNA-Gehalts im Schweiß,  $t = 15$  min bzw.  $t = 60$  min) reduzierte DRC zeigten, während im KORA-Kollektiv lediglich drei Proben auffällige Werte zeigten (siehe Tabelle 12 im Anhang). Diese Ergebnisse einer reduzierten oder verlangsamten Reparatur nach Behandlung mit genotoxischen Noxen in Proben eines Patienten-Kollektivs gegenüber einem Kollektiv von Kontrollproben konnten in der Literatur auch in früheren Studien gefunden werden, beispielsweise in einer Studie, in der die DRC nach Behandlung mit Bleomycin in einem Lungenkrebspatienten-Kollektiv ohne Einschränkung des Alters mit einer Kontrollpopulation verglichen wurde (Rajae-Bebahani *et al.*, 2001) und in einer Studie, in der die DRC nach Bestrahlung in Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen mit der eines Kontroll-Kollektivs verglichen wurde (Shahidi *et al.*, 2007). Lymphozyten, die von einem Kollektiv von Krebspatienten gewonnen wurden, zeigen also nach Behandlung mit genotoxischen Noxen eine weniger effektive SSB-Reparatur als Lymphozyten, die von gesunden Spenderpersonen stammen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Vergleich von Lymphozyten eines Kollektivs von Krebspatienten mit Lymphozyten einer Kontrollgruppe, die sich aus gesunden

Individuen zusammensetzt, bezüglich der DRC deutliche Unterschiede in der Effektivität der SSB-Reparatur aufzeigt. Obwohl die Mediane der DRC etwa gleich sind, ist die Anzahl der Patientenproben, die stark reduzierte Reparatur zeigen, deutlich höher als die Anzahl von Proben eines entsprechenden Kontroll-Kollektivs. Eine Analyse der Aktivität von Proteinen, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, ist ein möglicher nächster Schritt, um molekulare Marker zu finden, die einen Indikator für die Entstehung von Krebs darstellen (Lou *et al.*, 2007).

### **5.1.2 Untersuchungen des Basenexzisionsreparatur-Gens *XRCC1***

Es gibt einige Hinweise darauf, dass reduzierte DRC zu einer Anfälligkeit für Lungenkrebs führt (Zienolddiny *et al.*, 2006; Frosina, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass der größte Anteil der auftretenden endogenen Schäden in einer Zelle Basenschäden und DNA-SSB und lediglich ein geringer Anteil der Schädigungen DNA-DSB sind (Sak *et al.*, 2005), kann die BER als der Hauptreparaturweg, über den endogene Schäden repariert werden können, bezeichnet werden (Frosina, 2007). Eine wichtige Rolle in der BER spielt das Produkt des Gens *XRCC1* (siehe Kapitel 2.1.3.1), das als „Gerüstprotein“ mit einigen der an der BER beteiligten Proteine interagiert (Cornetta *et al.*, 2006).

Für die vorliegende Arbeit wurden im Rahmen einer persönlichen Absprache mit Dr. M. Gomolka, Dr. S. Hornhardt und Dr. U. Rößler aus dem FB Strahlenschutz und Gesundheit im Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) in München / Neuherberg bisher unveröffentlichte Ergebnisse zur Verfügung gestellt, nach denen eine Korrelation zwischen der DNA-Reparaturkapazität im alkalischen *Comet Assay* von Lymphozyten junger Lungenkrebspatienten, die an der LUCY-Studie teilnehmen, und dem Allelstatus des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) *XRCC1* Arg280His festgestellt werden konnte. Proben von Patienten, die Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) in mindestens einer Kopie sind, zeigten im alkalischen *Comet Assay* eine leicht verminderte DRC gegenüber Proben von Patienten, die homozygot das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) tragen. Die Genotypisierung erfolgte in einer Kooperation mit dem Institut für Epidemiologie am Helmholtz Zentrum München und der Abteilung Genetische Epidemiologie der Georg-August-Universität Göttingen. Auffällig ist bei diesen Ergebnissen, dass eine verminderte DRC im alkalischen *Comet Assay* bei Proben des LUCY-Kollektivs mit homozygotem oder heterozygotem Auftreten des seltenen Allels des SNP *XRCC1* Arg280His in Patientenproben der LUCY-Kohorte nachzuweisen war, nicht aber in Kontrollproben des KORA-Kollektivs. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass der SNP *XRCC1* Arg280His nicht von funktioneller Bedeutung für die BER ist, sondern

möglicherweise in Kopplung mit einem anderen SNP steht, der an der Krebsentstehung in LUCY-Patienten beteiligt ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere vergleichende molekulare und biochemische Untersuchungen an Zellen von Probanden, die für den SNP *XRCC1* Arg280His unterschiedlichen Allelstatus zeigten, durchgeführt. Da primäre Lymphozyten nur in limitierter Zahl von den jeweiligen Spendern gewonnen werden konnten, wurden lymphoblastoide Zelllinien aus Lymphozyten von Probanden der LUCY- und KORA-Kollektive, die für das seltene Allel (*XRCC1* 280His) oder das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) homozygot sind, sowie aus Lymphozyten von für diesen Locus heterozygoten Probanden generiert. Innerhalb des Kollektivs junger Lungenkrebspatienten konnten zwei für das seltene Allel (*XRCC1* 280His) homozygote Zelllinien, fünf heterozygote Zelllinien sowie drei für das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) homozygote Zelllinien für weitere Untersuchungen herangezogen werden. Zusätzlich konnten innerhalb der KORA-Kohorte drei Zelllinien, die homozygot das seltene Allel (*XRCC1* 280His) tragen, untersucht werden. Die relativ geringe Anzahl verfügbarer Zelllinien, die homozygote oder heterozygote Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) waren, beruht zum einen darauf, dass die Genotypisierung noch nicht für alle Probanden der Kollektive durchgeführt werden konnte, zum anderen basiert sie auf der geringen Allelfrequenz des seltenen Allels (*XRCC1* 280His). In einer Studie von Aka (*et al.*, 2004) wurde im untersuchten Kollektiv eine Allelfrequenz von 96,7% des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) gegenüber 3,3% des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) festgestellt. Ein weiterer Faktor, der die Anzahl der verfügbaren Zelllinien limitierte, war die teilweise nicht ausreichende Effizienz der Immortalisierung. Einige Zelllinien, die mittels EBV-Immortalisierung erzeugt wurden, konnten nicht langfristig in Kultur gehalten werden.

Eine mögliche Ursache für die verschiedenen Ausprägungen der DRC in den Proben, die verschiedene Varianten des SNP *XRCC1* Arg280His tragen, liegt in der jeweils in den Zellen vorhandenen Menge an Xrcc1-Protein. Liegt Xrcc1 in geringerer Konzentration vor, kann dies verminderte SSB-Reparatur bewirken. Daher wurde zunächst mittels *Western Blot* Analyse der Proteingehalt an Xrcc1 in den Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His ermittelt. Mit Hilfe der Analyse eines Haushaltsgens, dessen Genprodukt Tubulin in allen Zellen in gleicher Konzentration vorliegt, konnte gezeigt werden, dass die vorhandene Menge an Xrcc1 in den unterschiedlichen Zelllinien etwa gleich war. Daher wurde ein Einfluss des SNP Arg280His auf die Proteinmenge von Xrcc1 ausgeschlossen (siehe Abbildung 22 und Tabelle 5, Kapitel 4.1.2.2). Nach einer Ursache für

die reduzierte DRC in homozygoten und heterozygoten Trägern des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) wurde also mit anderen Ansätzen gesucht.

#### 5.1.2.1 Quantifizierung des NAD<sup>+</sup>-Gehalts

Der Versuch zur Ermittlung des NAD<sup>+</sup>-Gehalts in Zellextrakten wurde in der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung der BER-Aktivität in Abhängigkeit des Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His eingesetzt.

Wie bereits in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben, erfolgt im *short patch*-Reparaturweg der BER eine Interaktion der Proteine Xrcc1 und Parp1. Durch Parp1, ein Enzym von 113 kDa, das als Dimer aktiv ist, werden DNA-SSB erkannt (Bürkle, 2001). Im Anschluss an diese Erkennung erfolgt Poly(ADP)ribosylierung verschiedener Akzeptormoleküle, darunter auch die DNA der Bruchstelle und Parp1. Die Poly(ADP)ribosylierung ist somit als Teil der BER eine direkte Antwort eukaryotischer Zellen auf DNA-Schäden, die durch ionisierende Bestrahlung, alkylierende Agenzien oder Oxidantien bewirkt werden können (Bürkle, 2001). Abhängig von der Poly(ADP)ribosylierung, die an diesen geschädigten Bereichen der DNA auftritt, kann Xrcc1 an einen SSB rekrutiert werden. Diese Rekrutierung des Gerüstproteins Xrcc1 an die Schadensstelle führt zu negativer Regulation der Parp1-Aktivität (Brem und Hall, 2005; Masson *et al.*, 1998).

Die Poly(ADP)ribosylierung der Akzeptormoleküle durch Parp1 erfolgt unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup>. Aufgrund dieser Tatsache kann die enzymatische Aktivität von Parp1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit schädigenden Noxen anhand des in Zellextrakten vorhandenen Gehalts an NAD<sup>+</sup> ermittelt werden. Hierbei ist anzunehmen, dass eine hohe enzymatische Aktivität zu stark verringertem Gehalt an NAD<sup>+</sup> in Zellextrakten von behandelten gegenüber unbehandelten Zellen führt, während geringe enzymatische Aktivität entsprechend eine schwächere Reduktion des Gehalts an NAD<sup>+</sup> nach Behandlung mit schädigenden Noxen bewirkt.

Der SNP *XRCC1* Arg280His, dessen Analyse ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, liegt im *XRCC1*-Gen im Bereich zwischen der zentral liegenden BRCT1-Domäne, die die Interaktion von Xrcc1 mit Parp1 und Parp2 ermöglicht, und der N-terminalen Domäne. Sollte der SNP eine Veränderung der Konformation von Xrcc1 bewirken, könnte dies zu veränderter Interaktion von Xrcc1 und Parp1 führen. Durch eine reduzierte Interaktion von Xrcc1 mit Parp1 kann die negative Regulierung von Parp1 durch Xrcc1 nur in geringerem Maß

auftreten. Dadurch wird die Poly(ADP)ribosylierung unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  nicht oder verzögert unterbrochen. Unter diesen Umständen ist zu erwarten, dass eine veränderte BER-Aktivität in Trägern des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) gegenüber Trägern des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) als veränderte Parp1-Aktivität zu messen ist. In der Versuchsdurchführung mittels einer Zeitreihe nach Behandlung mit schädigenden Noxen sollte sich dies durch verstärkte Abnahme an  $\text{NAD}^+$  äußern.

#### **5.1.2.2 Quantifizierung des $\text{NAD}^+$ -Gehalts nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung**

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Zellextrakten aus Zellen, die für den SNP *XRCC1* Arg280His verschiedenen Allelstatus zeigten. Zunächst wurde die Abnahme des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts in Zellextrakten der jeweiligen Zelllinien einer Zeitreihe folgend nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung erfasst. Durch ionisierende Strahlung werden in der DNA in einer großen Zahl Basenschäden, darunter 8-oxo-Guanin (8-oxo-7,8-dihydro-Guanin), aber auch *AP-Sites* (abasische Stellen) und Strangbrüche induziert. Diese Schädigungen können direkt durch die Bestrahlung und auch indirekt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), die durch Radiolyse des Wassers in Gegenwart von Sauerstoff gebildet werden, entstehen.

Nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung mit einer Dosis von 4 Gy konnte in keiner der drei verschiedenen Gruppen von Zelllinien (homozygote Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) und des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sowie heterozygote Träger) zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min und 180 min nach Bestrahlung eine Abnahme des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts in Zellextrakten nachgewiesen werden.

Das vorliegende Protokoll ist möglicherweise nicht sensitiv genug, um die verhältnismäßig geringe Anzahl durch eine relativ geringe Dosis von 4 Gy induzierten DNA-SSB in humanen Zellen nachzuweisen. Auch in der Literatur konnte kein Beispiel für eine signifikante Reduktion des Gehalts an  $\text{NAD}^+$  in Zellen verschiedener Spezies nach geringen Dosen ionisierender Bestrahlung gefunden werden. In einer Studie an murinen Lymphomzelllinien konnte nach Behandlung mit 2 Gy ionisierender Bestrahlung in einem Zeitverlauf von bis zu 35 min nach Bestrahlung lediglich eine Schwankung der Werte zwischen etwa 80% und 115% des ursprünglichen  $\text{NAD}^+$ -Gehalts nachgewiesen werden (Kleczkowska *et al.*, 2002). Diese Schwankung um den Wert von 100% deckt sich in etwa mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werten zwischen 60% und 180%, eine eindeutige Abnahme konnte nicht

festgestellt werden (siehe Abbildung 23, Kapitel 4.1.2.3.1). Nach Bestrahlung mit 10 Gy ionisierender Strahlung von Thymozyten aus der Maus konnte in einer weiteren Studie eine Verarmung auf bis zu 60% des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts unbestrahlter Proben erreicht werden (Denisenko *et al.*, 1989). In einer Studie, die die Analyse der Reaktion auf Bestrahlung in *Caenorhabditis elegans* zum Ziel hatte, konnte nach einer Dosis ionisierender Strahlung von 60 Gy eine Reduktion des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts auf maximal 50% des Gehalts in einer unbestrahlten Kontrolle festgestellt werden, während nach einer Dosis von 120 Gy eine Reduktion auf etwa 10% erreicht werden konnte (Dequen *et al.*, 2005). Derartig hohe Dosen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, da sie außerhalb des Bereichs physiologischer Einzeldosen, wie sie beispielsweise in der Radiotherapie angewendet werden, lagen.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass nach ionisierender Strahlung keine Abnahme des Gehalts an  $\text{NAD}^+$  in den untersuchten Zellextrakten nach Bestrahlung mit 4 Gy nachgewiesen werden konnte. Auch in der Literatur wurde kein Beispiel für eine erfolgreiche Messung einer Reduktion von  $\text{NAD}^+$  in humanen Zellen nach ionisierender Strahlung mit geringen Dosen gefunden. Daher wurde die Analyse der Abnahme von  $\text{NAD}^+$  in weiteren Versuchen mit Hilfe von Zellextrakten, die nach Behandlung mit MMS gewonnen wurden, durchgeführt.

### **5.1.2.3 Quantifizierung des $\text{NAD}^+$ -Gehalts nach Behandlung mit MMS**

Die Zellextrakte wurden (entsprechend den Versuchen nach Bestrahlung) einer Zeitreihe folgend nach Behandlung mit MMS (Methylmethansulfonat) gewonnen und dem zyklischen Enzym-Assay, der dem Feststellen des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts in Zellextrakten dient, unterzogen. Bei MMS handelt es sich um ein alkylierendes Agens (Horton *et al.*, 2008), das alkalilabile Basenschäden und damit AP-Stellen, die zu SSB umgewandelt werden können, induziert.

Es konnte ein geringer, allerdings nicht signifikanter Unterschied in der Abnahme des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts zwischen der Gruppe der Zelllinien, die für das seltene Allel (*XRCC1* 280His) homozygot sind, und den beiden Gruppen, die das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) in mindestens einer Kopie tragen, festgestellt werden. Während die Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sowie die heterozygoten Zelllinien zum Zeitpunkt 180 min nach Zugabe von 1 mM MMS eine stärkere Verarmung an  $\text{NAD}^+$  auf bis zu 27% des Anfangsgehalts zeigten, war die Verarmung in homozygoten Trägern des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) auf bis zu 54% deutlich schwächer. Aufgrund der großen Schwankungen der Ergebnisse in verschiedenen Versuchsansätzen kann der Unterschied nicht als signifikant betrachtet werden (siehe Abbildung 24, Kapitel 4.1.2.3.1). Für dieses Resultat konnte in einer Studie, die die

Quantifizierung von intrazellulären NAD(P)H-Mengen in für *XRCC1* defizienten im Vergleich zu profizienten CHO (*chinese hamster ovary*) -Zellen zum Ziel hatte, keine Bestätigung gefunden werden (Nakamura *et al.*, 2003). In dieser Studie konnte nach Behandlung mit MMS eine stärkere Verarmung an  $\text{NAD}^+$  in der für *XRCC1* defizienten Zelllinie auf ca. 20% des Ausgangsgehalts im Vergleich zu etwa 40% in der profizienten Zelllinie gefunden werden. Auch in Studien, deren Ziel die Analyse von für *XRCC1* defiziente CHO-Zellen, die mit humanem *XRCC1* mit verschiedenem Allelstatus für die SNP *XRCC1* Arg280His und *XRCC1* Arg399Gln (Pachkowski *et al.*, 2006; Takanami *et al.*, 2005) transfiziert wurden, konnte schwächere Abnahme an  $\text{NAD}^+$  in den Zelllinien, die Träger des jeweiligen häufigen Allels sind, nachgewiesen werden. Bei Pachkowski (*et al.*, 2006) zeigten die Zelllinien, die das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) tragen, eine Reduktion auf etwa 90% der Menge, während die Zelllinien, die homozygot das seltene Allel (*XRCC1* 280His) tragen, eine Reduktion auf etwa 50% der  $\text{NAD}^+$ -Menge in unbehandelten Zellen zeigten. Ähnliche Werte konnten auch bei Takanami (*et al.*, 2005) gefunden werden. In diesen Zelllinien ist offensichtlich die Interaktion von Parp1 mit Xrcc1 durch den SNP *XRCC1* Arg280His bzw. *XRCC1* Arg399Gln vermindert. Brem und Hall (2005) konnten zeigen, dass menschliche Brustkrebszelllinien, deren *XRCC1* Expression mittels RNAi herunterreguliert wurde, ebenfalls eine stärkere  $\text{NAD}^+$ -Verarmung zeigten als Kontrollzelllinien, die mit siRNA, die keine Homologie zu humanen Gensequenzen zeigte, transfiziert wurden.

Ein Problem der verschiedenen Studien an genetisch veränderten Hamsterzellen liegt in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf menschliche Zellen von verschiedenen Personen. In den Analysen von Nakamura (*et al.*, 2003), Pachkowski (*et al.*, 2006) und Takanami (*et al.*, 2005) wurden, um gleichen genetischen Hintergrund zu haben, CHO-Zellen eingesetzt, die für *XRCC1* defizient sind (EM7 bzw. EM9), sowie für *XRCC1* profiziente Zellen (AA8). Mit Hilfe der CHO-Zellen mit gleichem genetischen Hintergrund sollte versucht werden, individuelle Unterschiede in der Expression weiterer Gene als Faktoren, die die Ergebnisse der Analysen beeinflussen können, auszuschließen. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Zelllinien aus humanen Probanden und Patienten mit verschiedenem genetischen Hintergrund verwendet.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass im Gegensatz zu Hamsterzelllinien im vorliegenden Zellsystem keine signifikanten Unterschiede in der Verarmung an  $\text{NAD}^+$  nach Behandlung mit MMS zwischen Zelllinien, die homozygot für das seltene (*XRCC1* 280His) oder das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) sind sowie für heterozygote Zelllinien gefunden werden



konnten. Möglicherweise greifen in diesen Zelllinien weitere Mechanismen der DNA-Reparatur regulierend ein, die in Hamsterzelllinien nicht vorliegen. Eine Folge davon könnte sein, dass auch in Abwesenheit von *Xrcc1* durch andere Interaktionspartner von *Parp1* ein Fortschreiten der Reparatur ermöglicht wird und so die Poly(ADP)ribosylierung durch solche Proteine inhibiert werden könnte.

#### 5.1.2.4 Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur

Ein weiterer Ansatz, die Aktivität der BER in den Zelllinien, die für eine der beiden Varianten am Locus 280 im *XRCC1*-Gen homozygot sind, zu untersuchen, bestand in der Analyse von BER-Produkten, die mit Hilfe eines dsDNA-Oligomers, das an definierter Stelle ein Uracil gepaart mit einem Guanin aufweist, erzeugt wurden. Die Quantifizierung der BER-Produkte erfolgte in Zellextrakten, die aus Zelllinien gewonnen wurden, die für das seltene (*XRCC1* 280His) bzw. das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) homozygot sind. Zur Reparatur des dsDNA-Oligomers wurde den Zellextrakten das radioaktiv markierte Nukleotid [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP sowie ein ddTTP als „Stopp-Nukleotid“ zugegeben. Als Produkt des *short patch*-Reparaturwegs resultiert ein 35mer, für den *long patch*-Reparaturweg ein 16mer und im Fall inkompletter Reparaturereignisse ein 15mer. Die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Oligomere können mit Hilfe eines Röntgenfilms visualisiert und deren Menge durch die Software Image Master TotalLab quantifiziert und verglichen werden (Harrigan *et al.*, 2006; Muftuoglu *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse im Nachweis von Produkten der BER in der Positivkontrolle stehen in guter Übereinstimmung mit der Literatur (siehe Abbildung 27, Kapitel 4.1.2.4.3). Brem und Hall (2005) konnten in einer vergleichenden Analyse von Kontrollzellen und mit siRNA gegen *XRCC1* transfizierten Zellen mit Hilfe der Quantifizierung des Gehalts von  $\text{NAD}^+$  nach Behandlung mit MMS eine stärkere Verarmung an  $\text{NAD}^+$  in für *Xrcc1* herunterregulierten Zellen gegenüber Kontrollzellen feststellen. Dies ist ein Hinweis für reduzierte SSB-Reparatur in den behandelten Zellen sowie die Beteiligung von *Xrcc1* an diesen SSB-Reparaturprozessen. In der vorliegenden Arbeit wurde der *in vitro* Versuch zur Quantifizierung von BER-Produkten mit Zellextrakten von Zellen durchgeführt, die mit siRNA gegen *XRCC1* behandelt wurden, und von Kontrollzellen, die mit siRNA, die nicht zu humanen Gensequenzen homolog ist, transfiziert wurden. In diesem Versuch konnte in Zellen, die mit siRNA gegen *XRCC1* transfiziert wurden, nach einer Reparaturdauer von 10 min und 20 min ebenfalls reduzierte Reparatur gegenüber den Kontrollzellen festgestellt

werden. Anhand dieser Positivkontrolle konnte festgestellt werden, dass der Einfluss von verschieden ausgeprägter Xrcc1-Aktivität in Zelllinien auf den *short patch*-Reparaturweg der BER anhand der Quantifizierung von BER-Produkten gemessen werden kann. Die Analyse des *long patch*-Reparaturwegs ergab keinen Unterschied zwischen Zellen mit unterschiedlicher Aktivität von Xrcc1. Dies kann dadurch begründet werden, dass das Xrcc1-Protein eine wichtige Rolle im *short patch*-Weg der BER spielt, jedoch am *long patch*-Reparaturweg nur nachrangig beteiligt ist (Fortini und Dogliotti, 2007).

Aufgrund der Ergebnisse, die für die Positivkontrolle gewonnen wurden, wurde der Versuch zur Quantifizierung von BER-Produkten im Anschluss in Zellextrakten durchgeführt, die aus den LCL gewonnen wurden, die unterschiedlichen Allelstatus für den SNP *XRCC1* Arg280His aufweisen. Ziel dieser Analysen war es, festzustellen, ob homozygote Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) weniger Reparatur zeigen als homozygote Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg).

Das Bild der Versuche, die an LCL durchgeführt wurden, zeigte sich weniger eindeutig als in den Versuchen mit für *XRCC1* herunterregulierten Zellen. Im Vergleich der beiden Kontrollzelllinien SiMo und DaSa, die homozygote Träger des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) sind, lagen die Intensitäten der Banden für das *short patch*-BER-Produkt auf dem Röntgenfilm der Linie DaSa nach einer Reparaturdauer von 10 min und 20 min im Bereich der Intensitäten für das *short patch*-BER-Produkt für die Linie SiMo, während bei einer Reparaturdauer von 15 min ein leicht erhöhter Gehalt an Reparaturprodukten von etwa 170% des Gehalts der Linie SiMo vorliegt. Die Zelllinie, die aus Lymphozyten eines Patienten des LUCY-Kollektivs, der für das seltene Allel homozygot ist, hergestellt wurde, zeigte für die verschiedenen Reparaturzeiten eine auf etwa 70% bis 90% der Kontrolllinie SiMo gesenkte Menge an Reparaturprodukt. In Zelllinien, die aus Lymphozyten von Probanden des KORA-Kollektivs erzeugt wurden, die ebenfalls homozygote Träger des seltenen Allels sind, zeigten sich stark unterschiedliche Ergebnisse. Während zwei der Linien mit 200% bis 600% ein Vielfaches der Menge an Reparaturprodukt in der Kontrolle SiMo zeigten, wies eine der Zelllinien etwa gleichen Gehalt wie die Linie SiMo auf (siehe Abbildung 27, Kapitel 4.1.2.4.3).

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit bisher unveröffentlichten Ergebnissen, die im Rahmen einer persönlichen Absprache mit dem BfS zur Verfügung gestellt wurden. Im BfS wurde ebenfalls nur für Träger des seltenen Allels (*XRCC1* 280His), die dem LUCY-Kollektiv zugehörig sind, nicht jedoch für Probanden der KORA-Kohorte

reduzierte Reparatur im alkalischen *Comet Assay* nach ionisierender Bestrahlung im Vergleich mit homozygoten Trägern des häufigen Allels (*XRCC1* 280Arg) gefunden. Eine mögliche Deutung dieser Ergebnisse ist, dass der SNP *XRCC1* Arg280His selber keine funktionelle Bedeutung hat, jedoch in den Proben des LUCY-Kollektivs mit einem SNP mit funktioneller Bedeutung gekoppelt ist. Kopplung zwischen zwei SNP tritt häufig auf und erschwert die Identifizierung von SNP, die funktionelle Bedeutung für den Phänotyp haben gegenüber SNP, die mit funktionellen SNP assoziiert sind (Crawford und Nickerson, 2005). Im *XRCC1*-Gen konnten bereits einige Beispiele für gekoppeltes Auftreten von SNP gefunden werden. So liegt beispielsweise eine ungleiche Verteilung im kombinierten Auftreten des Allels (*XRCC1* 280His) mit dem Allel (*XRCC1* 194Arg) und (*XRCC1* 399Arg) vor (Pachkowski *et al.*, 2006). Die Kombination (*XRCC1* 194Arg) - (*XRCC1* 280Arg) - (*XRCC1* 399Arg) liegt am häufigsten vor, die Kombination (*XRCC1* 194Arg) - (*XRCC1* 280His) - (*XRCC1* 399Arg) seltener als zu erwarten wäre. Durch Sangrajrang (*et al.*, 2007) konnte in einer Untersuchung zur Korrelation des Auftretens von SNP in drei BER-Genen und dem Brustkrebsrisiko von Thailänderinnen gezeigt werden, dass bestimmte Kombinationen der Varianten der drei SNP in *XRCC1*, die am häufigsten auftreten, nämlich Arg194Trp, Arg280His und Arg399Gln, mit erhöhtem Risiko für Brustkrebs assoziiert sind, während andere Haplotypen im untersuchten Kollektiv nicht nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Studie des BfS fand sich laut einer Metaanalyse verschiedener Studien keine Korrelation zwischen dem Status des SNP Arg280His und erhöhtem Krebsrisiko (Hung *et al.*, 2005).

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in Lymphozyten von jungen Lungenkrebspatienten das homozygote Auftreten des seltenen Allels (*XRCC1* 280His) mit reduzierter SSB-Reparatur und mit reduzierter BER-Aktivität korreliert ist, jedoch nicht in gesunden Spenderpersonen. Es ist daher zu vermuten, dass der SNP keine eigene funktionelle Bedeutung hat, sondern möglicherweise in Lungenkrebspatienten mit einem weiteren SNP gekoppelt vorliegt, der funktionelle Veränderungen hervorrufen kann.

## **5.2 Nachweis der Apoptose nach ionisierender Bestrahlung**

Apoptose spielt eine entscheidende Rolle für die Wahrung der genetischen Stabilität (Bassi *et al.*, 2003). Tritt beispielsweise durch ionisierende Strahlung eine DNA-Schädigung auf, die nicht repariert werden kann, kann dies zu Zelltod führen; die geschädigte Zelle wird also aus dem Gewebe entfernt (Bassi *et al.*, 2003). Bei Erreichen eines Kontrollpunkts zwischen

verschiedenen Zellzyklusphasen wird in Zellen, die durch Strahlung geschädigt wurden, die Entscheidung zwischen Überleben und Zelltod getroffen (Wistop *et al.*, 2005). Ein wichtiger strahleninduzierter Zelltodmechanismus ist die Apoptose (Verheij und Bartelink, 2000). Daher wurde bereits in einigen Studien die strahleninduzierte Apoptosereaktion moduliert, um so die Strahlenempfindlichkeit zu modifizieren (Verheij und Bartelink, 2000). Für die Entscheidung, ob in einer Zelle Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose stattfinden, spielt der Tumorsuppressor p53 eine große Rolle (Latonen und Laiho, 2005). p53 wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert, aber es weist in inaktiver Form eine geringe Halbwertszeit auf. Aufgrund von strahleninduzierten DNA-Schäden wird p53 aktiviert und damit stabilisiert, wodurch die Halbwertszeit erhöht und der mitochondrial vermittelte Apoptoseweg eingeleitet wird. In mehr als 50% aller Tumoren liegt eine veränderte Form von p53 vor, was zu veränderter Strahlenantwort in diesen Zellen führen kann (Latonen und Laiho, 2005).

Hohe Apoptoseraten sind in Organismen, die genotoxischen Noxen ausgesetzt wurden, als positiv im Sinne des Gesamtorganismus zu werten. Die Begründung hierfür liegt in der Entfernung geschädigter Zellen. Körperzellen, deren DNA beispielsweise aufgrund ionisierender Strahlung Schäden aufweist, können durch Apoptose gezielt an weiterer Proliferation und somit der Verbreitung geschädigter Zellen im Organismus gehindert werden, ohne dabei das betroffene Gewebe weiter zu beeinträchtigen (Wistop *et al.*, 2005). Erfolgt dagegen der Zelltod unkontrolliert beispielsweise als Nekrose, kann dies zu Entzündungsreaktionen des bestrahlten Gewebes führen, da die geschädigten Zellen unkontrolliert zerstört werden (Delanian und Lefaix, 2007). Grundsätzlich wäre es sinnvoll, die verschiedenen Arten des Zelltodes nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, jedoch ist bisher hauptsächlich die Apoptose im Fokus der Analysen.

Der Nachweis der Apoptose kann mit Hilfe einer Vielzahl von Merkmalen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit schädigenden Noxen wie beispielsweise ionisierender Strahlung getroffen werden. Ein frühes Ereignis der Apoptose ist zum Beispiel die Aktivierung von Caspasen (Degterev *et al.*, 2003), die mit Hilfe der Immundetektion analysiert werden kann. Ebenso kann die Menge an aktiven Caspasen in einer bestrahlten Zellpopulation durch einen Fluorochrom-markierten Caspaseinhibitor quantifiziert werden (Smolewski, 2002). Die Fragmentierung der DNA dagegen tritt relativ spät in der Apoptose auf, sie kann beispielsweise mit der TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP- nick-end labelling*) Reaktion (Wistop *et al.*, 2005), im Agarosegel oder mit der Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Mattes, 2007) nachgewiesen werden. Um die

strahleninduzierten Apptoseraten in primären Lymphozyten des Patienten-Kollektivs der LUCY-Studie mit den Zellen des Kontroll-Kollektivs der KORA-Studie zu vergleichen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Annexin V-Assay gewählt, dessen Wirkungsweise auf einer apoptosetypischen Membranveränderung, der Präsentation von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran, beruht (Vermes *et al.*, 1995). Dieser Versuch hat gegenüber anderen Nachweismethoden den Vorteil, dass in kurzer Zeit große Mengen an Proben verarbeitet werden können. Zudem ist durch die Doppelfärbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin V und Propidiumiodid (PI) eine spezifische Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen, die ebenfalls Teil der Zelltodantwort der Lymphozyten waren, möglich (Vermes *et al.*, 1995). Nekrotische Zellen weisen eine poröse Membran auf, daher kann in diese Zellen sowohl PI als auch Annexin V eindringen, während apoptotische Zellen eine intakte Zellmembran aufweisen, und daher lediglich mit Annexin V-FITC markiert sind.

### **5.2.1 Annexin V-Assay in primären Lymphozyten**

Die Analyse der Apoptose für den Vergleich zwischen dem Patienten-Kollektiv und dem Kontroll-Kollektiv erfolgte zunächst an primären Lymphozyten der Probanden, da aus Blutproben ohne großen Aufwand und Schädigung des Individuums Lymphozyten gewonnen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden für jede Probe Apoptose- und Nekroseraten in unbestrahlten Kontrollen sowie nach Bestrahlung mit 0,4 Gy und 0,8 Gy ermittelt. Dies war nötig, da die Proben aufgrund der Kryokonservierung bereits in unbehandeltem Zustand stark unterschiedliche Verteilung der Zellen in normale, apoptotische und nekrotische Zellen zeigten (siehe Abbildung 32, Kapitel 4.2.1.2). Durch die geeignete Einteilung der Signale mit Hilfe der Software des Durchflusszytometers in Signale für normale, apoptotische und nekrotische Fraktionen war es möglich, den prozentualen Anteil der verschiedenen Fraktionen vor und nach Bestrahlung zu ermitteln. In Zusammenarbeit mit H. Braselmann aus der Arbeitsgruppe Zytogenetik des Instituts für Molekulare Strahlenbiologie des Helmholtz Zentrums München wurde die in Kapitel 4.2.1.1 beschriebene Formel für die Berechnung der rein strahleninduzierten Apoptose entwickelt. Das Ziel dieser Art der statistischen Aufarbeitung war, vergleichbare Werte für die ausschließlich durch Strahlung induzierten Apptoseraten in den einzelnen Proben zu erhalten. Eine Berücksichtigung der „Basalapoptose“ sowie der nekrotischen Fraktion bei der Ermittlung der strahleninduzierten Apoptose wurde so bisher in der Literatur nicht beschrieben. In bisherigen vergleichenden Analysen der Apoptosehäufigkeit in Proben eines Patienten-Kollektivs mit

Proben eines Kollektivs gesunder Spender wurden die „Basalapoptose“ in unbehandelten Proben sowie die induzierte Apoptose ohne Berücksichtigung nekrotischer Zellen isoliert betrachtet (Barber *et al.*, 2000; Crompton *et al.*, 2000).

Es wurde die Verteilung der Werte, die mit Hilfe der in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen Formel errechnet wurden, für die jeweiligen Proben des KORA- und LUCY-Kollektivs, die nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen ermittelt wurden, betrachtet. Es zeigte sich, dass die Werte innerhalb einer Probengruppe in etwa einer Normalverteilung folgten (Tabelle 14 und Tabelle 15, Anhang). Laut Borgmann (*et al.*, 2008) kann die Variation verschiedener Parameter zur Beschreibung individueller Strahlenantworten generell durch eine Normalverteilung beschrieben werden. Die intraindividuelle Streuung der Kontrolle SM (in Abbildung 31, Kapitel 4.2.1.1 als kurze rote Linien dargestellt) umfasst mit einer Weite von etwa 40% einen deutlich geringeren Bereich als die interindividuelle Streuung in den beiden Proben-Kollektiven mit Weiten von 52% bis 72%. Dies konnte auch bereits in früheren Studien mit verschiedenen Versuchsansätzen bezüglich der Analyse der Apoptose festgestellt werden (Wistop *et al.*, 2005; Barber *et al.*, 2000; Crompton *et al.*, 2000). Wurden die Medianwerte der beiden Kollektive miteinander verglichen, zeigte sich für die Proben des LUCY-Kollektivs eine leicht erhöhte strahleninduzierte Apoptose im Vergleich zu den Proben des KORA-Kollektivs. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

In einer Studie an Proben, die aus einem Kollektiv von 31 Brustkrebspatientinnen gewonnen wurden (Barber *et al.*, 2000), konnten im Gegensatz dazu mit Hilfe der TUNEL Reaktion deutlich reduzierte Werte für die Apoptoserate in Vergleich zu 13 Kontrollproben von gesunden Spenderpersonen gefunden werden. Die Autoren postulieren, dass Brustkrebspatientinnen aufgrund einer genetischen Prädisposition, die sich nur mit geringer Penetranz manifestiert, größere Strahlensensitivität aufweisen als gesunde Personen (Barber *et al.*, 2000). Diese Sensitivität gegenüber ionisierender Bestrahlung äußert sich durch reduzierte Apoptoseraten, die wiederum zu vermehrtem Überleben geschädigter Zellen führen. Dieses Überleben veränderter Zellen zeichnet sich verantwortlich für die in den Patientinnen gefundene Disposition für Krebs. Ein deutlicher Kritikpunkt an dieser Studie ist die geringe Größe der analysierten Kollektive. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, wäre eine deutliche Vergrößerung der Kollektive wünschenswert. In einer weiteren Studie wurde das Apoptoseverhalten von Proben gesunder Spendern, von aufgrund ihrer Strahlenreaktion unauffälligen Krebspatienten, von strahlenempfindlichen Krebspatienten sowie von Personen, die an AT oder einer entsprechenden genetischen Störung leiden, verglichen. Hier konnte kein

Unterschied in der strahleninduzierten Apoptose von gesunden Spenderpersonen und unauffälligen Krebspatienten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war ein deutlicher Unterschied in den Apoptoseraten zwischen strahlenauffälligen Patienten und den Kontrollproben erkennbar (Crompton *et al.*, 2000). In dieser Studie wurde deutlich, dass die für strahlenempfindliche Patienten ermittelten Apoptosewerte am unteren Extremwert, aber noch innerhalb der Werte der Normalverteilung der klinisch unauffälligen Patienten liegen.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der in der vorliegenden Arbeit gefundene geringe Unterschied in den Medianwerten für strahleninduzierte Apoptoseraten der KORA- und LUCY-Kollektive statistisch nicht signifikant ist. Die Werte sind normalverteilt, es finden sich keine „Ausreißer“. Auffällige Proben könnten durch die größere Anzahl unauffälliger Proben maskiert vorliegen und in der Normalverteilung nicht offensichtlich sichtbar sein.

#### **5.2.1.1 Auswahl der Proben für eine EBV-vermittelte Immortalisierung**

Für die analysierten Patienten-Kollektive lagen keine klinischen Daten für eine Bestrahlungstherapie vor. Zudem konnten im Annexin V-Assay zur Analyse des strahleninduzierten Apoptoseverhaltens keine „Ausreißer“ in den jeweiligen Proben-Kollektiven gefunden werden; die Ergebnisse folgten einer Normalverteilung. Dikomey (*et al.*, 2003) analysierten, dass die Variation individueller Strahlenempfindlichkeit unabhängig von den gewählten Endpunkten einer Analyse immer einer Normalverteilung ohne „Ausreißer“ folgt. In einer Studie von Borgmann (*et al.*, 2008) bezüglich Chromosomenaberrationen konnte zudem festgestellt werden, dass auffällige Proben in einer Normalverteilung maskiert vorliegen können. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch in der vorliegenden Arbeit in den normalverteilten Ergebnissen für den Annexin V-Assay strahlenauffällige Proben vorliegen können, die als solche nicht direkt erkannt werden. Diese Proben sind in den „Randbereichen“ der Normalverteilung zu erwarten. Auch in einer früheren Studie, in der ein unauffälliges Patienten-Kollektiv mit einem Kontroll-Kollektiv bezüglich der Apoptose verglichen wurde (Crompton *et al.*, 2000), konnten zwischen den beiden Proben-Kollektiven keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Daher erfolgte die Auswahl der Proben für eine EBV-vermittelte Immortalisierung sowohl in dem Patienten-Kollektiv als auch in dem Kontroll-Kollektiv. Es wurden Proben ausgewählt, die übereinstimmend nach beiden Bestrahlungsdosen erhöhte oder gesenkte Werte zeigten (Crompton *et al.*, 2000; Borgmann *et al.*, 2008).

Die Analyse im Annexin V-*Assay* erfolgte in einer Mischpopulation, die hauptsächlich aus T-Zellen und in einem weitaus geringeren Maß aus B-Zellen bestand (siehe Abbildung 34, Kapitel 4.2.1.4), wie mit Hilfe von Antikörpern spezifisch gegen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) bzw. gegen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) festgestellt werden konnte. Weitere Analysen sollten mit lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) durchgeführt werden, die aufgrund der EBV-vermittelten Immortalisierung jedoch ausschließlich aus B-Zellen gewonnen wurden. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Subpopulationen weißer Blutkörperchen im direkten Vergleich unterschiedliche Apoptoseraten zeigen (Wistop *et al.*, 2005; Wilkins *et al.*, 2002). Aufgrund des gleichen genetischen Hintergrunds von B- und T-Zellen innerhalb eines Spenders wurde in der vorliegenden Arbeit dennoch die Annahme getroffen, dass im Vergleich zweier Kollektive diejenigen Individuen, deren T-Zellen *in vitro* erhöhte Strahlenempfindlichkeit zeigen, übereinstimmend auch in den B-Zellen erhöhte Strahlenempfindlichkeit aufweisen.

Um für weitere Analysen größere Mengen an Zellen zur Verfügung zu haben, wurden aufgrund dieser Annahme für ausgewählte Proben mit auffälligen Apoptoseraten korrespondierende lymphoblastoide Zelllinien hergestellt und analysiert.

### **5.2.2 Vergleich des Apoptoseverhaltens in lymphoblastoiden Zelllinien und primären Lymphozyten**

Lymphozyten von Probanden sind nur in limitierter Menge verfügbar. Daher sollte in einem Vergleich zwischen den im Annexin V-*Assay* ermittelten Apoptoseraten der primären Proben und dem Apoptoseverhalten von daraus abgeleiteten LCL festgestellt werden, ob für weitere Analysen diese Zelllinien die primären Proben ersetzen können. In der vorliegenden Arbeit zeigten die aus primären Lymphozyten abgeleiteten LCL Ergebnisse, die von denen der korrespondierenden primären Lymphozyten abweichen. Während in den primären Proben deutliche Unterschiede in der strahleninduzierten Apoptoseantwort gefunden werden konnten, waren diese in den LCL nicht mehr eindeutig nachweisbar. Auch in früheren Studien wurden bereits LCL eingesetzt, um Apoptose zu analysieren (Zhao *et al.*, 2001; Wistop *et al.*, 2000). In einer der Studien (Zhao *et al.*, 2001) wurden LCL, die aus Blut von Lungenkrebspatienten hergestellt wurden, mit LCL, die aus Blut von gesunden Spendern gewonnen wurden, bezüglich der durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten Apoptose und der p53 Antwort verglichen. Hier konnte mit Hilfe von zwei apoptosespezifischen *Assays* festgestellt werden, dass die LCL, die aus Blut von Lungenkrebspatienten gewonnen wurden, geringere Apoptoseraten zeigten als die LCL von gesunden Spendern. Ebenso konnte festgestellt werden, dass die p53 Expression



in den Patientenproben höher war als in den Kontrollproben. Die zweite der beiden genannten Studien hatte einen Vergleich von LCL, die aus Zellen von gesunden Spendern hergestellt wurden, mit LCL aus Zellen von homozygoten und heterozygoten AT- und NBS-Patienten und LCL, die aus Zellen von Krebspatienten hergestellt wurden, die Grad 3 Spätreaktionen auf die Strahlentherapie gezeigt hatten, zum Ziel (Wistop *et al.*, 2000). In dieser zweiten Studie konnten ebenfalls für die LCL in mehreren Versuchen übereinstimmende Ergebnisse für die Raten an apoptotischen Zellen nach Bestrahlung gefunden werden. Im direkten Vergleich der Apoptoseinduktion in primären Lymphozyten mit Ergebnissen, die in verschiedenen Versuchsansätzen in lymphoblastoiden Zelllinien ermittelt wurden, konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Apoptoseverhalten primärer Zellen und davon abgeleiteter Zelllinien gefunden werden. Eine mögliche Begründung für dieses abweichende Verhalten der LCL liegt unter anderem in den Funktionen von EBV. In LCL liegt das Virusgenom in episomaler Form vor. Infizierte Zellen exprimieren in verschiedenen Latenzzuständen des Virus bis zu neun verschiedene virale Proteine, sechs dieser Proteine sind im Nucleus zu finden, drei sind membrangebunden (Klein *et al.*, 2007). In der für LCL typischen Latenzphase III, dem so genannten Wachstumsprogramm, werden alle neun Proteine exprimiert (Klein *et al.*, 2007). Eines dieser Proteine ist das integrale Membranprotein Lmp1 (*Epstein-Barr virus (EBV) -encoded latent membrane protein 1*). Es wirkt als ein konstitutiv aktiver Tumornekrosefaktor-Rezeptor TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) und kann so einige Signalfade aktivieren (Zheng *et al.*, 2007), darunter auch den *NFκB*-Weg (Bornkamm und Hammerschmidt, 2001). Durch Aktivierung von Survivin, einem Apoptoseinhibitorprotein (IAP, *inhibitor of apoptosis protein*), das durch *NFκB* aktiviert werden kann, kann Apoptose verhindert werden. Zusätzlich ist Lmp1 in der Lage, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zu aktivieren, die ihrerseits für die Aktivierung von zellulären Prozessen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli, wie beispielsweise ionisierende Strahlung, verantwortlich ist und so das Zellüberleben fördert (Dawson *et al.*, 2003). Solche Eingriffe in die Apoptoseantwort der Zellen durch das Virus sind eine gute Erklärung für die in allen Zelllinien etwa gleiche, schwach dosisabhängige Apoptosereaktion. Durch die *NFκB* induzierte Aktivierung von Survivin wird in LCL Apoptose als Antwort auf Bestrahlung inhibiert und tritt so nur in sehr geringem Maß auf. Selbst eine große Steigerung der Dosis von 4 Gy auf 12 Gy zeigte nur einen geringen Effekt, die Inhibierung der Apoptose durch Lmp1 überwiegt offensichtlich die Induktion von Apoptose durch Strahlung.

Mittels EBV immortalisierte B-Zelllinien sind also nicht das geeignete Zellsystem, um primäre Lymphozyten von Patienten in Untersuchungen bezüglich der strahleninduzierten

Apoptose zu ersetzen. Ein möglicherweise geeigneteres Zellsystem könnte beispielsweise durch Immortalisierung mit Hilfe des Vektors pGRN145 erzeugt werden, der die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT durch den MPSV-Promotor exprimiert (Riches *et al.*, 2001), da bei dieser Art der Behandlung auch in den Zelllinien nahezu ausschließlich zelleigene Proteine exprimiert werden. Durch diese Art der Immortalisierung wird in Zellen Telomerase konstant exprimiert und verhindert so die Verkürzung der Telomerenden, die Zellalterung und Zelltod bewirken würde (Bodnar *et al.*, 1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Vergleich bezüglich der strahleninduzierten Apoptose zwischen EBV-immortalisierter Zelllinien und den ursprünglichen primären Lymphozyten aufgrund der Veränderungen, die durch das Virusgenom im Metabolismus der Zellen erzeugt werden, nicht möglich war. Möglicherweise verhindert und maskiert das Virus die für die Blutzellen eines Individuums typische Apoptoseantwort auf ionisierende Strahlung durch Aktivierung von zelleigenen Signalketten, die zum Überleben der Zellen nach Schadensinduktion durch Strahlung führen.

### **5.3 Schlussfolgerung und Perspektiven**

Die Individualisierung der Strahlentherapie von Tumoren ist ein sehr wichtiges Ziel moderner Medizin. Diese Individualisierung wird durch eine Optimierung der Technologie der Bestrahlung erreicht, aber zunehmend ist man bemüht, für das Bestrahlungsschema die individuelle Empfindlichkeit der Patienten vor der Bestrahlung zu ermitteln und zu berücksichtigen. Es gibt eine Vielzahl von experimentellen Ansätzen, die bisher jedoch noch nicht durchschlagend erfolgreich war, eindeutige zellulär-funktionelle und / oder molekulare Marker für Strahlensensibilität zu definieren. In dieser Arbeit wurde die zelluläre Funktion der strahleninduzierten SSB-Reparatur und Apoptose auf ihre Brauchbarkeit als Marker für Strahlensensitivität untersucht.

Ein wichtiger Faktor, der in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, ist die versuchsbedingte intraindividuelle Schwankung. Anhand der Werte, die in allen Versuchen für die bei jedem Experiment mitgeführte Standardkontrolle ermittelt werden konnten, ist erkennbar, dass eine relativ große intraindividuelle Schwankung vorliegt. Um also für einzelne Proben eine sichere Aussage über die individuelle Strahlenempfindlichkeit zu treffen, sind eine mehrfache Wiederholung des *Comet Assays* und des *Annexin V-Assays* für jede der Proben sinnvoll. Eine zumindest einmalige Wiederholung der Versuche war in der

vorliegenden Arbeit aufgrund der stark begrenzten Probengröße leider nur für einzelne Proben möglich.

Bei einfacher Versuchsdurchführung für jede Probe ist der *Comet Assay* eine geeignete Methode, um die Variabilität der SSB-Reparaturraten zweier Kollektive von Probanden zu vergleichen. Verschiedene Proben-Kollektive mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Krebspatienten und gesunde Kontrollpersonen) zeigten auch unterschiedliche SSB-Reparaturraten. Ähnliche Befunde sind auch in der Literatur beschrieben (Lou *et al.*, 2007; Shahidi *et al.*, 2007).

Die Analyse der strahleninduzierten Apoptose in primären Lymphozyten ist nach den vorliegenden Ergebnissen nur begrenzt als Marker der Strahlenauffälligkeit von Proben-Kollektiven einsetzbar. Zwischen den beiden untersuchten Kollektiven (Patienten / Kontrollen) konnten wenn überhaupt nur geringe Unterschiede festgestellt werden. In lymphoblastoiden Zelllinien ist die Analyse der Apoptose mit Hilfe des Annexin V-Assays kein geeignetes Werkzeug, um strahlenauffällige Proben zu identifizieren, da durch die Expression der Proteine des Virus EBV, wie beispielsweise durch Lmp1, die Apoptoseinduktion verhindert wird (Klein *et al.*, 2007).

Offenbar sind die beiden Parameter SSB-Reparatur und Apoptose nicht ausreichend, um die Strahlenempfindlichkeiten der Proben einzelner Patienten zu vergleichen, wohingegen der Vergleich von zwei Kollektiven erfolgreich ist. Es fanden sich zudem keine Proben, die im *Comet Assay* und gleichzeitig im Annexin V-Assay auffälliges Verhalten zeigten. Es müssen weitere Parameter definiert werden, um eine umfassendere Analyse der an der Strahlenempfindlichkeit beteiligten Mechanismen zu ermöglichen.

Weiterführende Analysen könnten unter anderem Haplotypanalysen von Genen sein, die an der BER beteiligt sind, wie beispielsweise *OGG1*, *APE1* (Sangrajrang *et al.*, 2007), *MPG*, *PCNA*, *Polβ* und *Lig3* (Zienolddiny *et al.*, 2006). Sie sollten mit funktionellen Tests gekoppelt sein, wie sie in der vorliegenden Arbeit bereits bezüglich des SNPs *XRCC1* Arg280His begonnen wurden. Eine größer angelegte Analyse der Haplotypen könnte die Identifizierung von Korrelationen zwischen verschiedenen Varianten von SNP in BER-Genen ermöglichen. Zudem könnten Kombinationen von SNP in der LUCY-Kohorte auftreten, die von dem jeweiligen Auftreten in der Kontrollgruppe abweichen können.

Es erscheint sinnvoll, neben der BER bzw. SSB-Reparatur weitere Reparaturwege in die Analysen aufzunehmen, beispielsweise die Analyse der DSB-Reparatur durch den Nachweis von phosphoryliertem Histon H2AX ( $\gamma$ H2AX) oder durch die Quantifizierung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen. Diese Überlegung basiert auf der Tatsache, dass DSB häufig während der Induktion nahe benachbarter SSB und Basenschäden auftreten (McKinnon und Caldecott, 2007). Möglicherweise kann eine sehr effektive DSB-Reparatur an der Schadensstelle fehlerhafte SSB-Reparatur ausgleichen und so einen auffälligen Phänotyp maskieren.

Auch die Rolle von strahleninduzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Faktoren, die den Zellzyklus kontrollieren, können einen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von Zellen haben und sollten in weiteren Analysen berücksichtigt werden.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten und Zelllinien eines Kollektivs junger Lungenkrebspatienten (LUCY) mit denen eines Kollektivs gesunder Spender (KORA) verglichen. Zusätzlich wurden in jedem Versuch Lymphozyten derselben gesunden Spenderperson als Standardkontrolle eingesetzt. Die gewählten Parameter der Analysen waren DNA-Einzelstrangbruch (SSB, *single strand break*) -Reparatur nach ionisierender Strahlung mittels *Comet Assay* und strahleninduzierte Apoptose mittels Annexin V-Assay.

Die Menge der basalen (spontanen) DNA-SSB war in unbehandelten Proben für die jungen Lungenkrebspatienten leicht erhöht gegenüber den Kontrollproben. Der geringe Unterschied war jedoch nicht als signifikant zu bewerten. Die Reparatur der durch ionisierende Strahlung induzierten SSB erfolgte in vielen Proben des Kollektivs junger Lungenkrebspatienten verlangsamt, was in einer größeren Streuung der für die DNA-Reparaturkapazität nach 15 min bzw. 60 min Reparaturdauer errechneten Werte im Vergleich mit den entsprechenden Werten des Kontroll-Kollektivs erkennbar wurde.

Um die SSB-Reparatur, die über den Mechanismus der Basenexzisionsreparatur (BER) stattfindet, genauer zu untersuchen, erfolgten Analysen an lymphoblastoiden Zelllinien, die aus Proben der beiden Kollektive erzeugt wurden. Ausgewählt zur Immortalisierung mittels Epstein-Barr-Virus (EBV) wurden Lymphozyten, die für das häufige (*XRCC1* 280Arg) und das seltene Allel (*XRCC1* 280His) des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) *XRCC1* Arg280His homozygot bzw. heterozygot waren. Xrcc1 ist ein wichtiges Gerüstprotein in der BER. Die Aktivität der BER wurde indirekt über die Parp1-Aktivierung nach Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung und Methylmethansulfonat (MMS), sowie durch die vergleichende *in vitro* Quantifizierung der BER-Kapazität bestimmt. Bei der Analyse der Parp1-Aktivierung zeigten sich nach Bestrahlung keine, nach Behandlung mit MMS lediglich geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien mit verschiedenem Allelstatus. Die vergleichende *in vitro* Quantifizierung der BER-Kapazität wurde an Zelllinien durchgeführt, die für das seltene Allel (*XRCC1* 280His) homozygot waren. Die Menge an BER-Produkt wurde jeweils auf eine Kontrollprobe, die für das häufige Allel (*XRCC1* 280Arg) homozygot war, normalisiert, um Vergleichbarkeit zu erreichen. Die Zelllinie, die aus Zellen eines jungen Lungenkrebspatienten hergestellt wurde, zeigte etwa 70% - 90% der BER-Aktivität der Kontrollprobe, während zwei der Proben des Kontroll-Kollektivs 2 - 6 -fache BER-Aktivität und eine etwa gleiche BER-Aktivität wie die Kontrollprobe

zeigten. Eine mögliche Erklärung für diesen widersprüchlichen Befund könnte sein, dass der SNP *XRCC1* Arg280His selber keine funktionelle Bedeutung hat, jedoch in der Zelllinie des jungen Lungenkrebspatienten mit einem funktionellen SNP gekoppelt vorliegt.

Die Analyse der strahleninduzierten Apoptose in primären Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben der beiden Kollektive. Für jedes Kollektiv folgten die errechneten Werte der induzierten Apoptoseraten einer Normalverteilung. Anhand dieser Verteilung wurden Proben ermittelt, die besonders hohe und besonders niedrige Apoptoseraten aufwiesen, um weitere Analysen an daraus erzeugten lymphoblastoiden Zelllinien durchzuführen. Die Zelllinien wurden mittels durchflusszytometrischer Detektion von aktiven Caspasen durch einen fluorochrommarkierten Caspaseinhibitor und Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1) bezüglich ihrer strahleninduzierten Apoptoseraten untersucht. Diese Werte wurden mit den in den korrespondierenden primären Proben ermittelten Apoptoseraten verglichen. Es stellte sich heraus, dass keine Korrelation zwischen erhöhter Apoptose in primären Lymphozyten und erhöhter Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien bestand, da in den verschiedenen LCL keine signifikant unterschiedlichen Werte gemessen wurden. Dies könnte erklärt werden durch metabolische Veränderungen, die in den Zellen durch die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus, das zur Immortalisierung von B-Zellen eingesetzt wird, hervorgerufen werden. Eines der vom Virus exprimierten Proteine, das integrale Membranprotein Lmp1, kann durch die Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege Apoptose inhibieren.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Analyse der SSB-Reparatur mittels *Comet Assay* geeignet ist, die Reparaturraten strahleninduzierter DNA-SSB in Proben aus verschiedenen Krebspatienten-Kollektiven mit Proben aus Kontroll-Kollektiven zu vergleichen, während die Analyse der Apoptose mittels *Annexin V-Assay* keine Unterschiede zeigt. Offensichtlich ist die strahleninduzierte Apoptose kein optimaler Parameter, um Unterschiede in den zellulären Strahlenempfindlichkeiten von Kollektiven zu finden. Möglicherweise könnte durch eine Vergrößerung der Kollektive ein besseres Ergebnis erreicht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen haben nicht dazu geführt, dass Individuen mit erhöhter und reduzierter Strahlenempfindlichkeit identifiziert wurden. Hierfür müssten deutlich größere Kollektive analysiert werden. Um die intraindividuelle Schwankung der Messungen zu reduzieren, sind Mehrfachanalysen jeder Probe nötig. Dafür jedoch werden Proben viel größeren Volumens benötigt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aka, P., R. Mateuca, J.P. Buchet, H. Thierens, and M. Kirsch-Volders.** 2004. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res.* 556:169-81.
- Andreassen, C.N., J. Alsner, and J. Overgaard.** 2002. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis--where and how to look for it? *Radiother Oncol.* 64:131-40.
- Aylon, Y., and M. Kupiec.** 2004. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res.* 566:231-48.
- Barber, J.B., C.M. West, A.E. Kiltie, S.A. Roberts, and D. Scott.** 2000. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. *Radiat Res.* 153:570-8.
- Bassi, L., M. Carloni, R. Meschini, E. Fonti, and F. Palitti.** 2003. X-irradiated human lymphocytes with unstable aberrations and their preferential elimination by p53/survivin-dependent apoptosis. *Int J Radiat Biol.* 79:943-54.
- Becker, N., J. Warendorf.** 1998. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. Springer Verlag, Berlin.
- Bentzen, S.M.** 2006. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 6:702-13.
- Bodnar, A.G., M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C.P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner and W.E. Wright.** 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 279:349-352.
- Borgmann, K., U. Hoeller, S. Nowack, M. Bernhard, B. Roper, S. Brackrock, C. Petersen, S. Szymczak, A. Ziegler, P. Feyer, W. Alberti, and E. Dikomey.** 2008. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 71:256-64.
- Bornkamm, G.W., and W. Hammerschmidt.** 2001. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356:437-59.
- Brem, R., and J. Hall.** 2005. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* 33:2512-20.
- Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone.** 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 11:3155-62.
- Burkle, A.** 2001. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays.* 23:795-806.
- Burlacu, A.** 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 7:249-57.

- Burma, S., B.P. Chen, and D.J. Chen.** 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. 5:1042-8.
- Caldecott, K.W.** 2001. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*. 23:447-55.
- Cann, K.L., and G.G. Hicks.** 2007. Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol*. 85:663-74.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat.** 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 11:506-25.
- Collis, S.J., T.L. DeWeese, P.A. Jeggo, and A.R. Parker.** 2005. The life and death of DNA-PK. *Oncogene*. 24:949-61.
- Cornetta, T., F. Festa, A. Testa, and R. Cozzi.** 2006. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 66:537-45.
- Costa, R.M., V. Chigancas, S. Galhardo Rda, H. Carvalho, and C.F. Menck.** 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 85:1083-99.
- Crawford, D.C., and D.A. Nickerson.** 2005. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 56:303-20.
- Crompton, N.E., Y.Q. Shi, G.C. Emery, L. Wisser, H. Blattmann, A. Maier, L. Li, D. Schindler, H. Ozsahin, and M. Ozsahin.** 2001. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 49:547-54.
- Dawson, C.W., G. Tramontanis, A.G. Eliopoulos, and L.S. Young.** 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem*. 278:3694-704.
- Debatin, K.M., and P.H. Krammer.** 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 23:2950-66.
- Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan.** 2003. A decade of caspases. *Oncogene*. 22:8543-67.
- Delanian, S., and J.L. Lefaix.** 2007. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol*. 17:99-107.
- Denisenko, M.F., V.A. Soldatenkov, L.N. Belovskaya, and I.V. Filippovich.** 1989. Is the NAD-poly (ADP-ribose) polymerase system the trigger in radiation-induced death of mouse thymocytes? *Int J Radiat Biol*. 56:277-85.
- Dequen, F., S.N. Gagnon, and S. Desnoyers.** 2005. Ionizing radiations in *Caenorhabditis elegans* induce poly(ADP-ribosylation), a conserved DNA-damage response essential for survival. *DNA Repair (Amst)*. 4:814-25.
- Dikomey E., K. Borgmann, H. Jung, J. Peacock.** 2003. Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 56:1194-1200.



- Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl.** 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 26:199-213.
- Erster, S., and U.M. Moll.** 2005. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:843-50.
- Farooqui, A.A., L.A. Horrocks, and T. Farooqui.** 2007. Interactions between neural membrane glycerophospholipid and sphingolipid mediators: a recipe for neural cell survival or suicide. *J Neurosci Res*. 85:1834-50.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.
- Fortini, P., and E. Dogliotti.** 2007. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)*. 6:398-409.
- Frosina, G..** 2007. Tumor suppression by DNA base excision repair. *Mini Rev Med Chem*. 7:727-43.
- Fulda, S., and K.M. Debatin.** 2004a. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1028:150-6.
- Fulda, S., and K.M. Debatin.** 2004b. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1705:27-41.
- Gaivao, I., A. Piasek, A. Brevik, S. Shaposhnikov, and A.R. Collins.** 2007. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol*.
- Grzesiuk E..** 1998. The role of mutation frequency decline and SOS repair systems in methyl methanesulfonate mutagenesis. *Acta Biochim Pol*. 45:523-33.
- Guo, R.B., P. Rigolet, H. Ren, B. Zhang, X.D. Zhang, S.X. Dou, P.Y. Wang, M. Amor-Gueret, and X.G. Xi.** 2007. Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res*. 35:6297-310.
- Harrigan, J.A., D.M. Wilson, 3rd, R. Prasad, P.L. Opresko, G. Beck, A. May, S.H. Wilson, and V.A. Bohr.** 2006. The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res*. 34:745-54.
- Hefferin, M.L., and A.E. Tomkinson.** 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*. 4:639-48.
- Helleday, T..** 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*. 532:103-15.
- Helleday, T., J. Lo, D.C. van Gent, and B.P. Engelward.** 2007. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*. 6:923-35.

- Horton, J.K., M. Watson, D.F. Stefanick, D.T. Shaughnessy, J.A. Taylor, and S.H. Wilson.** 2008. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res.* 18:48-63.
- Huerta, S., E.J. Goulet, S. Huerta-Yepez, and E.H. Livingston.** 2007. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 139:143-56.
- Hung, R.J., P. Brennan, F. Canzian, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Zaridze, J. Lissowska, P. Rudnai, E. Fabianova, D. Mates, L. Foretova, V. Janout, V. Bencko, A. Chabrier, S. Borel, J. Hall, and P. Boffetta.** 2005. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 97:567-76.
- Hunter, A.M., E.C. LaCasse, and R.G. Korneluk.** 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis.* 12:1543-68.
- Jang, E.R., J.H. Lee, D.S. Lim, and J.S. Lee.** 2004. Analysis of ataxia-telangiectasia mutated (ATM)- and Nijmegen breakage syndrome (NBS)-regulated gene expression patterns. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130:225-34.
- Jeggo, P., and M. Lobrich.** 2006. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry.* 122:124-7.
- Jemal, A., A. Thomas, T. Murray, and M. Thun.** 2002. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 52:23-47.
- Jin, Z., and W.S. El-Deiry.** 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4:139-63.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-57.
- Kleczkowska, H.E., M. Malanga, I. Szumiel, and F.R. Althaus.** 2002. Poly ADP-ribosylation in two L5178Y murine lymphoma sublines differentially sensitive to DNA-damaging agents. *Int J Radiat Biol.* 78:527-34.
- Kleijer, W.J., V. Laugel, M. Berneburg, T. Nardo, H. Fawcett, A. Gratchev, N.G. Jaspers, A. Sarasin, M. Stefanini, and A.R. Lehmann.** 2008. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst).* 7:744-50.
- Klein, E., L.L. Kis, and G. Klein.** 2007. Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions. *Oncogene.* 26:1297-305.
- Kraemer, K.H., N.J. Patronas, R. Schiffmann, B.P. Brooks, D. Tamura, and J.J. DiGiovanna.** 2007. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience.* 145:1388-96.
- Krogh, B.O., and L.S. Symington.** 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* 38:233-71.
- Kruman, II, and E.I. Schwartz.** 2008. DNA damage response and neuroprotection. *Front Biosci.* 13:2504-15.

- Latonen, L., and M. Laiho.** 2005. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta*. 1755:71-89.
- Levine, B., and J. Yuan.** 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 115:2679-88.
- Liu, X., H. Zou, P. Widlak, W. Garrard, and X. Wang.** 1999. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem*. 274:13836-40.
- Lou, J., J. He, W. Zheng, L. Jin, Z. Chen, S. Chen, Y. Lin, and S. Xu.** 2007. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutat Res*. 617:104-10.
- Lowel, H., A. Doring, A. Schneider, M. Heier, B. Thorand, and C. Meisinger.** 2005. The MONICA Augsburg surveys--basis for prospective cohort studies. *Gesundheitswesen*. 67 Suppl 1:S13-8.
- Manor, E.** 2008. Human plasma accelerates immortalization of B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Cell Prolif*. 41:292-8.
- Martinon, F., and J. Tschopp.** 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*. 117:561-74.
- Masson, M., C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia, and G. de Murcia.** 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol*. 18:3563-71.
- Matakidou, A., R. el Galta, E.L. Webb, M.F. Rudd, H. Bridle, T. Eisen, and R.S. Houlston.** 2007. Genetic variation in the DNA repair genes is predictive of outcome in lung cancer. *Hum Mol Genet*. 16:2333-40.
- Mattes, M.J.** 2007. Apoptosis assays with lymphoma cell lines: problems and pitfalls. *Brit J Cancer*. 96:928-936.
- McKinnon, P.J., and K.W. Caldecott.** 2007. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 8:37-55
- Moller, P.** 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 98:336-45.
- Moore, D.J., R.M. Taylor, P. Clements, and K.W. Caldecott.** 2000. Mutation of a BRCT domain selectively disrupts DNA single-strand break repair in noncycling Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:13649-54.
- Mourgues, S., M.E. Lomax, and P. O'Neill.** 2007. Base excision repair processing of abasic site/single-strand break lesions within clustered damage sites associated with XRCC1 deficiency. *Nucleic Acids Res*. 35:7676-87.
- Muftuoglu, M., R. Kusumoto, E. Speina, G. Beck, W.H. Cheng, and V.A. Bohr.** 2008. Acetylation regulates WRN catalytic activities and affects base excision DNA repair. *PLoS ONE*. 3:1918.

- Muller-Vogt, U.S., J.E. Maurer, G.G. Grabenbauer, L.V. Distel, H. Iro, and H. Steinhart.** 2003. Altered DNA repair capacity in young patients suffering from multiple cancers. *Int J Mol Med.* 11:669-74.
- Nakamura, J., S. Asakura, S.D. Hester, G. de Murcia, K.W. Caldecott, and J.A. Swenberg.** 2003. Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in real time. *Nucleic Acids Res.* 31:e104.
- Neitzel, H.** 1986. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet.* 73:320-6.
- Nowak, J., M. Mosor, I. Ziolkowska, M. Wierzbicka, M. Pernak-Schwarz, M. Przyborska, K. Roznowski, A. Plawski, R. Slomski, and D. Januszkiewicz.** 2008. Heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene have a significantly increased risk of solid malignant tumours. *Eur J Cancer.* 44:627-30.
- Ostling, O., and K.J. Johanson.** 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123:291-8.
- Pachkowski, B.F., S. Winkel, Y. Kubota, J.A. Swenberg, R.C. Millikan, and J. Nakamura.** 2006. XRCC1 genotype and breast cancer: functional studies and epidemiologic data show interactions between XRCC1 codon 280 His and smoking. *Cancer Res.* 66:2860-8.
- Palyvoda, O., J. Polanska, A. Wygoda, and J. Rzeszowska-Wolny.** 2003. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol.* 50:181-90.
- Pichierri, P., A. Franchitto, and F. Palitti.** 2000. Predisposition to cancer and radiosensitivity. *Gen and Mol Biol.* 23:1101-1105.
- Plasterk, R.H.** 2002. RNA silencing: the genome's immune system. *Science.* 296:1263-5.
- Rajae-Behbahani, N., P. Schmezer, A. Risch, W. Rittgen, K.W. Kayser, H. Dienemann, V. Schulz, P. Drings, S. Thiel, and H. Bartsch.** 2001. Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 95:86-91.
- Riches, A., C. Peddie, S. Rendell, P. Bryant, H. Zitzelsberger, J. Bruch, J. Smida, L. Hieber, and M. Bauchinger.** 2001. Neoplastic transformation and cytogenetic changes after Gamma irradiation of human epithelial cells expressing telomerase. *Radiat Res.* 155:222-229.
- Rosen, E. M., S. Fan, I.D. Goldberg, and S. Rockwell.** 2000. Biological Basis of Radiation Sensitivity. *Oncology.* 14:543-550.
- Rosenberger, A., T. Illig, K. Korb, N. Klopp, V. Zietemann, G. Wolke, E. Meese, G. Sybrecht, F. Kronenberg, M. Cebulla, M. Degen, P. Drings, A. Groschel, N. Konietzko, K.G. Kreymborg, K. Haussinger, G. Hoffken, B. Jilge, Y.D. Ko, H. Morr, C. Schmidt, E.W. Schmidt, D. Tauscher, H. Bickeboller, and H.E. Wichmann.** 2008. Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years. *BMC Cancer.* 8:60.

- Ryter, S.W., H.P. Kim, A. Hoetzel, J.W. Park, K. Nakahira, X. Wang, and A.M. Choi.** 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 9:49-89.
- Sachs, L., and J. Hedderich.** 2006. Angewandte Statistik. *Springer Verlag, Berlin.* 12. Auflage.
- Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gurp, G. van Loo, and P. Vandenabeele.** 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23:2861-74.
- Saha, D.T., B.J. Davidson, A. Wang, A.J. Pollock, R.A. Orden, and R. Goldman.** 2008. Quantification of DNA repair capacity in whole blood of patients with head and neck cancer and healthy donors by comet assay. *Mutat Res.* 650:55-62.
- Sak, S.C., P. Harnden, C.F. Johnston, A.B. Paul, and A.E. Kiltie.** 2005. APE1 and XRCC1 protein expression levels predict cancer-specific survival following radical radiotherapy in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 11:6205-11.
- Saleh-Gohari, N., and T. Helleday.** 2004. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res.* 32:3683-8.
- Salvioli, S., M. Capri, P. Tieri, J. Laroni, C. Barbi, L. Invidia, S. Altília, A. Santoro, C. Pirazzini, M. Pierini, E. Bellavista, L. Alberghina, and C. Franceschi.** 2008. Different types of cell death in organismal aging and longevity: state of the art and possible systems biology approach. *Curr Pharm Des.* 14:226-36.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.* 2nd Edition.
- Sangrajrang, S., P. Schmezer, I. Burkholder, P. Waas, P. Boffetta, P. Brennan, H. Bartsch, S. Wiangnon, and O. Popanda.** 2007. Polymorphisms in three base excision repair genes and breast cancer risk in Thai women. *Breast Cancer Res Treat.*
- Schabath, M.B., M.R. Spitz, H.B. Grossman, K. Zhang, C.P. Dinney, P.J. Zheng, and X. Wu.** 2003. Genetic instability in bladder cancer assessed by the comet assay. *J Natl Cancer Inst.* 95:540-7.
- Schlotterer, C.** 2004. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? *Nat Rev Genet.* 5:63-9.
- Schmezer, P., N. Rajae-Bebahani, A. Risch, S. Thiel, W. Rittgen, P. Drings, H. Dienemann, K.W. Kayser, V. Schulz, and H. Bartsch.** 2001. Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 16:25-30.
- Schneider, J., T. Illig, A. Rosenberger, H. Bickeböller, H.E. Wichmann.** 2008. Detection of ATM gene mutations in young lung cancer patients: a population-based control study. *Arch Med Res.* 39:226-31.
- Scott, D., J.B. Barber, A.R. Spreadborough, W. Burrill, and S.A. Roberts.** 1999. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol.* 75:1-10.

- Seegenschmiedt, M.H., R. Müller, K. Höffken, T. Junginger, and H. Sauer.** 1999. Dokumentation von Nebenwirkungen in der Onkologie. *Deutsches Ärzteblatt*. 8:489-495.
- Seemanova, E., P. Jarolim, P. Seeman, R. Varon, M. Digweed, M. Swift, and K. Sperling.** 2007. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst*. 99:1875-80.
- Shahidi, M., H. Mozdarani, and P.E. Bryant.** 2007. Radiation sensitivity of leukocytes from healthy individuals and breast cancer patients as measured by the alkaline and neutral comet assay. *Cancer Lett*. 257:263-73.
- Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff.** 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 18:134-47.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, and E.L. Schneider.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175:184-91.
- Smolewski, P., J. Grabarek, H.D. Halicka, and Z. Darzynkiewicz.** 2002. Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J Immunol Methods*. 265:111-21.
- Szumiel, I.** 2008. Intrinsic radiation sensitivity: cellular signaling is the key. *Radiat Res*. 169:249-58.
- Takanami, T., J. Nakamura, Y. Kubota, and S. Horiuchi.** 2005. The Arg280His polymorphism in X-ray repair cross-complementing gene 1 impairs DNA repair ability. *Mutat Res*. 582:135-45.
- Tauchi, H.** 2000. Positional cloning and functional analysis of the gene responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1. *J Radiat Res (Tokyo)*. 41:9-17.
- Taylor, A.M.** 2001. Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol*. 14:631-44.
- Taylor, A.M., A. Groom, and P.J. Byrd.** 2004. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)*. 3:1219-25.
- Taylor, R.M., D.J. Moore, J. Whitehouse, P. Johnson, and K.W. Caldecott.** 2000. A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. *Mol Cell Biol*. 20:735-40.
- Taylor, R.M., A. Thistlethwaite, and K.W. Caldecott.** 2002. Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 22:2556-63.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4.
- Trzeciak, A.R., J. Barnes, and M.K. Evans.** 2008. A modified alkaline comet assay for measuring DNA repair capacity in human populations. *Radiat Res*. 169:110-21.

- Tuschl, T.** 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem.* 2:239-45.
- Varon, R., C. Vissinga, M. Platzer, K.M. Cerosaletti, K.H. Chrzanowska, K. Saar, G. Beckmann, E. Seemanova, P.R. Cooper, N.J. Nowak, M. Stumm, C.M. Weemaes, R.A. Gatti, R.K. Wilson, M. Digweed, A. Rosenthal, K. Sperling, P. Concannon, and A. Reis.** 1998. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell.* 93:467-76.
- Verheij, M., and H. Bartelink.** 2000. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301:133-42.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger.** 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39-51.
- Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman.** 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 84:627-39.
- Vidal, A.E., S. Boiteux, I.D. Hickson, and J.P. Radicella.** 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.* 20:6530-9.
- Wang, J., H.J. Chun, W. Wong, D.M. Spencer, and M.J. Lenardo.** 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13884-8.
- Weiss, K.M.** 1998. In search of human variation. *Genome Res.* 8:691-7.
- Wilkins, R.C., D. Wilkinson, H.P. Maharaj, P.V. Bellier, M.B. Cybulski, and J.R. McLean.** 2002. Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells. *Mutat Res.* 513:27-36.
- Wilson, D.M., 3rd, and V.A. Bohr.** 2007. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst).* 6:544-59.
- Wistop, A., U. Keller, C.N. Sprung, G.G. Grabenbauer, R. Sauer, and L.V. Distel.** 2005. Individual radiosensitivity does not correlate with radiation-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines or CD3+ lymphocytes. *Strahlenther Onkol.* 181:326-35.
- Wood, R.D., M. Mitchell, and T. Lindahl.** 2005. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res.* 577:275-83.
- Wright, E.G.** 1999. Inherited and inducible chromosomal instability: a fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumourigenesis. *J Pathol.* 187:19-27.
- Wu, X., J. Gu, and M.R. Spitz.** 2007. Mutagen sensitivity: a genetic predisposition factor for cancer. *Cancer Res.* 67:3493-5.
- Wyatt M.D. and D.L. Pittmann.** 2006. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* 19: 1580-94.
- Yan, N., and Y. Shi.** 2005. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:35-56.

- Yang, J.K.**. 2008. FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J.* 49:19-27.
- Yu, L., M.J. Lenardo, and E.H. Baehrecke.** 2004. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle.* 3:1124-6.
- Zhao, H., M.R. Spitz, G.E. Tomlinson, H. Zhang, J.D. Minna, and X. Wu.** 2001. Gamma-radiation-induced G2 delay, apoptosis, and p53 response as potential susceptibility markers for lung cancer. *Cancer Res.* 61:7819-24.
- Zheng, H., L.L. Li, D.S. Hu, X.Y. Deng, and Y. Cao.** 2007. Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell Mol Immunol.* 4:185-96.
- Zienolddiny, S., D. Campa, H. Lind, D. Ryberg, V. Skaug, L. Stangeland, D.H. Phillips, F. Canzian, and A. Haugen.** 2006. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 27:560-7.



## 8 Anhang

**Tabelle 6: Mit Hilfe des TOM im *Comet Assay* ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Kontrollzellen SM nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy.**

In der Spalte „Versuch“ ist die Kennung des Experiments angegeben, die Spalte „Gruppe“ zeigt an, in welcher Auswertungsgruppe die Werte erhoben wurden. Unter „DRC 15 min“ sind die unter Verwendung des TOM errechneten Werte der DNA-Reparaturkapazität nach einer Reparaturdauer von 15 min angegeben, unter „DRC 60 min“ stehen entsprechend die Werte der DRC nach 60 min Reparaturdauer angegeben.

Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
C51	1	0,750	0,895	LP39	1	0,821	0,938
C52	1	0,821	0,904	LP40	1	0,858	0,944
C61	1	0,813	0,906	LP41	1	0,839	0,926
C62	1	0,742	0,926	LP42	1	0,825	0,940
C63	1	0,867	0,913	LP43	1	0,826	0,953
C64	1	0,800	0,924	LP44	1	0,875	0,972
C65	1	0,820	0,926	LP45	1	0,814	0,932
C66	1	0,802	0,912	LP46	1	0,846	0,932
C67	1	0,823	0,915	LP47	1	0,841	0,901
C68	1	0,826	0,953	LP48	1	0,798	0,924
C69	1	0,783	0,936	LP49	1	0,520	0,321
C70	1	0,804	0,945	LP50	1	0,643	0,936
C72	1	0,821	0,870	LP53	2	0,769	0,914
C73	1	0,866	0,940	LP54	1	0,764	0,923
C74	1	0,805	0,915	LP55	2	0,876	0,917
C75	1	0,743	0,867	LP56	2	0,774	0,931
C76	1	0,774	0,877	LP57	2	0,818	0,961
C77	1	0,813	0,910	LP58	1	0,804	0,886
C78	1	0,773	0,893	LP59	1	0,841	0,899
Jena1	3	0,879	0,997	LP71	1	0,831	0,919
Jena2	3	0,658	0,786	LP79	1	0,635	0,896
Jena3	3	0,841	1,051	LP80	2	0,815	0,901
Jena4	3	0,829	0,916	LP81	2	0,845	0,913
Jena5	3	0,721	0,968	LP82	2	0,822	0,951
Jena6	3	0,775	0,907	LP84	1	0,752	0,917
Jena7	3	0,815	0,967	LP85	1	0,692	0,917
Jena8	3	0,548	0,739	LP86	2	0,783	0,905
Jena9	3	0,851	0,935	LP87	2	0,790	0,957
Jena10	3	0,796	0,975	LP88	2	0,818	0,913
Jena11	3	0,900	0,981	LP89	2	0,774	0,927
Jena12	3	0,837	0,800	LP90	2	0,803	0,948
Jena13	3	0,853	0,960	LPL3	2	0,757	0,934
Jena14	3	0,822	0,947	LPL4	2	0,583	0,912
Jena15	3	0,892	0,976	LPL5	2	0,752	1,029
LP2	1	0,811	0,957	LPL6	2	0,847	0,961
LP3	1	0,784	0,912	LPL7	2	0,824	0,951
LP4	1	0,723	0,883	LPL8	2	0,927	0,945
LP5	1	0,685	0,861	LPL9	2	0,966	0,984
LP6	1	0,731	0,841	LPL10	2	0,711	0,854
LP7	1	0,831	0,967	LPL12	2	0,941	1,035
LP8	1	0,852	0,949	LPL13	2	0,940	0,933
LP9	1	0,802	0,976	LPL14	2	0,854	0,941
LP10	1	0,839	0,933	LPL17	2	0,813	0,953
LP11	1	0,839	0,914	LPL18	2	0,619	0,963
LP12	1	0,801	0,915	LPL19	2	0,771	0,857
LP13	1	0,833	0,916	LPL20	2	0,801	0,908
LP14	1	0,789	0,950	LPL21	2	0,675	0,876
LP15	1	0,728	0,908	LPL22	2	0,514	0,870
LP16	1	0,748	0,896	LPL23	2	0,732	0,890
LP17	1	0,831	0,926	LPL24	2	0,818	0,916

Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
LP18	1	0,750	0,927	LPL25	2	0,792	0,767
LP19	1	0,791	0,911	LPL26	2	0,860	0,936
LP20	1	0,853	0,956	LPL27	2	0,704	0,866
LP23	1	0,839	0,958	LPL28	2	0,899	0,927
LP24	1	0,838	0,942	LPL29	2	0,818	0,986
LP25	1	0,810	0,957	LPL30	2	0,797	0,958
LP26	1	0,818	0,914	LPL31	2	0,655	0,897
LP27	1	0,825	0,905	LPL32	2	0,400	0,906
LP28	1	0,816	0,933	LPL33	2	0,792	0,937
LP29	1	0,813	0,912	LPL34	2	0,703	0,847
LP30	1	0,801	0,936	LPL35	2	0,875	0,912
LP31	1	0,770	0,897	LPL36	2	0,673	1,036
LP32	1	0,838	0,927	LPL37	2	0,683	0,920
LP33	1	0,804	0,937	LPL38	2	0,737	0,902
LP34	1	0,810	0,924	LPL39	2	0,894	0,866
LP35	1	0,783	0,908	LPL40	2	0,864	0,995
LP36	1	0,810	0,921	LPV1	2	0,499	0,855
LP37	1	0,826	0,945	LPV2	2	0,842	0,910
LP38	1	0,840	0,959	LUP	2	0,840	0,970

**Tabelle 7: Mit Hilfe des TOM im Comet Assay ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Proben des KORA-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy.**

In der Spalte „Proband“ ist die Nummer der Probe angegeben, die Spalte „Gruppe“ zeigt an, in welcher Auswertungsgruppe die Werte erhoben wurden. Unter „DRC 15 min“ sind die unter Verwendung des TOM errechneten Werte der DNA-Reparaturkapazität nach einer Reparaturdauer von 15 min angegeben, unter „DRC 60 min“ stehen entsprechend die Werte der DRC nach 60 min Reparaturdauer angegeben.

Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
1412132	1	0,611	0,907	1494668	1	0,782	0,911
1412574	2	0,859	0,883	1494685	1	0,567	0,928
1412970	1	0,708	0,862	1494696	1	0,674	0,897
1413915	2	0,710	0,860	1495024	1	0,766	0,941
1414649	2	0,897	0,956	1495134	1	0,785	0,913
1416309	1	0,833	0,940	1495134	1	0,823	0,907
1416785	2	0,767	0,945	1495134	1	0,753	0,921
1417107	2	0,655	0,639	1495254	1	0,787	0,936
1417448	2	0,857	0,918	1495376	1	0,690	0,902
1417577	2	0,879	0,926	1495554	1	0,829	0,954
1417632	2	0,911	0,985	1495582	1	0,788	0,933
1417896	2	0,670	0,930	1495717	1	0,721	0,921
1418306	2	0,737	1,016	1495835	1	0,695	0,923
1418489	2	0,812	1,032	1496031	1	0,805	0,925
1419630	2	0,754	0,936	1496156	1	0,712	0,890
1420304	2	0,064	0,736	1496195	1	0,745	0,932
1420488	2	0,626	1,000	1497114	1	0,692	0,863
1420961	1	0,824	0,917	1497241	1	0,814	0,909
1425018	1	0,701	0,922	1497241	1	0,819	0,979
1432404	1	0,829	0,933	1497241	1	0,787	0,939
1432973	1	0,810	0,919	1810174	3	0,870	0,975
1434457	1	0,628	0,887	1810461	3	0,922	1,006
1438657	1	0,795	0,960	1811019	3	0,790	0,913
1440848	1	0,848	0,952	1811135	3	0,856	1,026
1441079	1	0,745	0,902	1811711	3	0,769	0,893
1442168	1	0,616	0,895	1811769	3	0,744	0,788
1446250	1	0,754	0,919	1813540	3	0,922	0,979
1446272	1	0,841	0,975	1813714	3	0,773	0,932
1451985	1	0,675	0,794	1814181	3	0,881	0,963
1452384	1	0,807	0,903	1814959	3	0,646	0,918
1452843	1	0,782	0,908	1815343	3	0,711	0,828
1453181	1	0,828	0,930	1815455	3	0,917	0,960
1453347	1	0,655	0,910	1816918	3	0,719	0,864
1453500	1	0,808	0,931	1817816	3	0,739	0,959
1453575	1	0,780	0,908	1817827	3	0,788	0,921
1458032	1	0,749	0,895	1818401	3	0,833	0,943
1459242	1	0,831	0,936	1819402	3	0,746	0,818
1467304	2	0,673	0,885	1819645	3	0,899	0,995
1467681	2	0,657	0,908	1820215	3	0,730	1,000
1467846	2	0,571	0,855	1820558	3	0,455	0,850
1468014	2	0,816	0,980	1820976	3	0,815	0,937
1468042	2	0,865	0,981	1822409	3	0,759	0,935
1468369	2	0,741	0,833	1826224	3	0,843	1,046
1468476	2	0,533	0,922	1828516	3	0,817	0,928
1468487	2	0,793	0,903	1828773	3	0,940	0,967
1468594	2	0,655	0,839	1829455	3	0,865	0,978
1468682	2	0,698	0,831	1830005	3	0,775	0,880
1468874	2	0,739	0,967	1833245	3	0,916	0,992
1468891	2	0,667	0,928	1837718	3	0,293	0,923
1468984	2	0,745	0,865	1842418	3	0,665	0,954
1474844	2	0,826	0,953	1843600	3	0,903	0,995
1475497	2	0,751	0,947	1845086	3	0,677	0,945
1479102	1	0,744	0,912	1845517	3	0,851	0,970
1481472	1	0,810	0,955	1845860	3	0,886	0,957

---

Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
1487580	1	0,796	0,899	1845893	3	0,803	0,839
1491588	1	0,730	0,898	1845964	3	0,936	1,020
1494153	1	0,705	0,914	1846570	3	0,773	1,065
1494226	1	0,791	0,932	1847664	3	0,818	0,932
1494394	1	0,766	0,908	1848770	3	0,483	0,954
1494435	1	0,783	0,941	1849278	3	0,870	1,008
1494435	1	0,736	0,880	1849793	3	0,774	0,892
1494544	1	0,854	0,946	1852204	3	0,747	0,936
1494569	1	0,824	0,927	1852505	3	0,841	0,946

**Tabelle 8: Mit Hilfe des TOM im Comet Assay ermittelte DNA-Reparaturkapazität in Proben des LUCY-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy.**

In der Spalte „Patient“ ist die jeweilige Familienkennung des Patienten angegeben, die Spalte „Gruppe“ zeigt an, in welcher Auswertungsgruppe die Werte erhoben wurden. Unter „DRC 15 min“ sind die unter Verwendung des TOM errechneten Werte der DNA-Reparaturkapazität nach einer Reparaturdauer von 15 min angegeben, unter „DRC 60 min“ stehen entsprechend die Werte der DRC nach 60 min Reparaturdauer angegeben.

Patient	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Patient	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
3011-200	2	0,872	0,749	13055-200	1	0,810	0,982
3012-200	2	0,893	0,898	13058-200	2	0,856	0,395
4015-200	2	0,479	0,701	13058-200	2	0,894	0,985
4023-200	2	0,429	0,961	14032-200	1	0,836	0,923
4033-200	2	0,141	0,432	16006-200	2	0,858	0,930
4034-200	2	0,844	1,057	16026-200	2	0,958	0,909
4037-200	2	0,819	0,955	16027-200	2	0,836	0,906
4043-200	2	0,738	0,930	16028-200	2	0,611	1,582
4047-200	2	0,860	0,937	16034-200	2	0,817	0,780
4049-200	2	0,828	0,943	16037-200	2	0,831	0,982
4051-200	2	0,798	0,984	17007-200	2	0,756	0,902
4068-200	2	0,824	0,991	17011-200	2	0,821	0,909
5009-200	2	0,731	0,913	17011-200	2	0,638	0,707
6009-200	2	0,467	0,069	17013-200	1	0,849	0,922
6025-200	2	0,714	0,950	19012-200	1	0,733	0,903
6025-200	2	0,784	0,957	19016-200	2	0,852	0,999
8005-200	2	0,939	0,891	19019-200	2	0,764	0,782
8023-200	1	0,651	0,900	19021-200	2	0,431	-0,315
8026-200	2	0,903	0,941	19021-200	2	0,763	0,974
8027-200	2	0,810	0,916	19023-200	2	0,844	0,794
8028-200	2	0,798	0,891	19024-200	2	0,830	0,905
8033-200	1	0,842	0,937	19025-200	2	0,976	0,945
8035-200	2	0,868	0,978	20005-200	1	0,779	0,927
8040-200	2	0,795	0,954	20017-200	2	0,698	0,916
8041-200	2	0,831	0,979	20025-200	2	0,783	0,950
8042-200	2	0,890	1,020	20028-200	2	0,772	1,044
8043-200	1	0,440	0,909	20030-200	2	0,666	0,754
8047-200	2	0,577	1,095	20031-200	1	0,737	0,923
8053-200	2	0,490	0,957	20032-200	1	0,902	0,817
12003-200	2	0,790	0,946	20035-200	2	0,722	0,929
12006-200	2	0,782	0,896	20037-200	1	0,649	0,836
12006-200	2	0,873	0,995	20041-200	2	0,899	1,023
12006-200	2	0,768	0,983	29008-200	2	0,878	0,947
12013-200	1	0,684	0,920	29008-200	2	0,779	0,843
12016-200	2	0,813	0,921	29009-200	2	0,672	0,951
12016-200	2	0,773	1,032	29009-200	2	0,739	0,963
12018-200	2	0,351	0,713	29011-200	2	0,815	0,783
13009-200	2	0,762	0,219	29012-200	2	0,814	0,969
13014-200	2	0,117	0,630	29012-200	2	0,933	0,991
13014-200	2	0,852	0,960	29015-200	2	0,789	0,855
13020-200	1	0,369	0,987	29016-200	2	0,946	0,988
13023-200	2	0,650	1,005	29019-200	2	0,740	0,873
13023-200	1	0,799	0,937	29022-200	2	0,748	0,678
13024-200	2	0,737	0,877	29023-200	2	0,638	0,215
13026-200	2	0,817	0,932	29024-200	2	0,587	1,028
13026-200	2	0,977	0,924	29029-200	2	0,835	0,907
13042-200	2	0,639	0,891	29031-200	2	0,535	0,791
13042-200	2	0,691	0,933	32004-200	1	0,684	0,967
13043-200	2	0,820	0,873	32005-200	1	0,770	0,842
13044-200	2	0,908	0,975	32006-200	2	0,881	0,844
13050-200	2	0,700	0,830	32007-200	2	0,870	0,999

**Tabelle 9: Mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im *Comet Assay* ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Kontrollzellen SM nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy.**

In der Spalte „Versuch“ ist die Kennung des Experiments angegeben, die Spalte „Gruppe“ zeigt an, in welcher Auswertungsgruppe die Werte erhoben wurden. Unter „DRC 15 min“ sind die unter Verwendung des TOM errechneten Werte der DNA-Reparaturkapazität nach einer Reparaturdauer von 15 min angegeben, unter „DRC 60 min“ stehen entsprechend die Werte der DRC nach 60 min Reparaturdauer angegeben.

Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
C51	1	0,661	0,850	LP39	1	0,746	0,873
C52	1	0,741	0,859	LP40	1	0,791	0,916
C61	1	0,760	0,870	LP41	1	0,767	0,868
C62	1	0,683	0,884	LP42	1	0,768	0,900
C63	1	0,799	0,884	LP43	1	0,773	0,918
C64	1	0,735	0,872	LP44	1	0,798	0,974
C65	1	0,755	0,891	LP45	1	0,733	0,888
C66	1	0,719	0,852	LP46	1	0,767	0,877
C67	1	0,730	0,878	LP47	1	0,782	0,843
C68	1	0,786	0,929	LP48	1	0,771	0,866
C69	1	0,727	0,909	LP49	1	0,556	-0,044
C70	1	0,775	0,925	LP50	1	0,493	0,883
C72	1	0,751	0,823	LP53	2	0,717	0,870
C73	1	0,794	0,923	LP54	1	0,687	0,873
C74	1	0,687	0,876	LP55	2	0,842	0,886
C75	1	0,681	0,815	LP56	2	0,711	0,882
C76	1	0,711	0,836	LP57	2	0,759	0,923
C77	1	0,724	0,859	LP58	1	0,735	0,859
C78	1	0,701	0,860	LP59	1	0,766	0,869
Jena1	3	0,783	0,990	LP71	1	0,757	0,874
Jena2	3	0,745	0,903	LP79	1	0,486	0,835
Jena3	3	0,765	1,012	LP80	2	0,790	0,869
Jena4	3	0,809	0,918	LP81	2	0,831	0,931
Jena5	3	0,689	0,987	LP82	2	0,801	0,929
Jena6	3	0,709	0,804	LP84	1	0,700	0,893
Jena7	3	0,774	0,910	LP85	1	0,661	0,866
Jena8	3	0,594	0,794	LP86	2	0,717	0,884
Jena9	3	0,867	0,924	LP87	2	0,770	0,943
Jena10	3	0,778	0,973	LP88	2	0,796	0,870
Jena11	3	0,911	0,975	LP89	2	0,711	0,885
Jena12	3	0,885	0,790	LP90	2	0,766	0,941
Jena13	3	0,872	0,946	LPL3	2	0,733	0,939
Jena14	3	0,785	0,875	LPL4	2	0,532	0,946
Jena15	3	0,911	0,989	LPL5	2	0,709	1,080
LP2	1	0,769	0,936	LPL6	2	0,812	0,951
LP3	1	0,746	0,873	LPL7	2	0,795	0,970
LP4	1	0,715	0,874	LPL8	2	0,972	0,944
LP5	1	0,611	0,832	LPL9	2	0,992	0,985
LP6	1	0,761	0,873	LPL10	2	0,697	0,808
LP7	1	0,780	0,930	LPL12	2	0,905	1,011
LP8	1	0,726	0,902	LPL13	2	0,872	0,932
LP9	1	0,809	0,975	LPL14	2	0,802	0,923
LP10	1	0,772	0,889	LPL17	2	0,861	0,969
LP11	1	0,931	0,934	LPL18	2	0,544	0,997
LP12	1	0,745	0,830	LPL19	2	0,791	0,799
LP13	1	0,818	0,860	LPL20	2	0,775	0,912
LP14	1	0,731	0,910	LPL21	2	0,573	0,859
LP15	1	0,645	0,870	LPL22	2	0,416	0,844
LP16	1	0,664	0,877	LPL23	2	0,688	0,880
LP17	1	0,773	0,884	LPL24	2	0,783	0,910
LP18	1	0,689	0,877	LPL25	2	0,744	0,570
LP19	1	0,765	0,863	LPL26	2	0,864	0,906
LP20	1	0,799	0,947	LPL27	2	0,495	0,829

Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Versuch	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
LP23	1	0,812	0,950	LPL28	2	0,876	0,923
LP24	1	0,783	0,912	LPL29	2	0,755	1,051
LP25	1	0,739	0,920	LPL30	2	0,845	1,007
LP26	1	0,767	0,868	LPL31	2	0,546	0,842
LP27	1	0,773	0,867	LPL32	2	0,165	0,944
LP28	1	0,761	0,907	LPL33	2	0,802	0,986
LP29	1	0,733	0,874	LPL34	2	0,635	0,774
LP30	1	0,722	0,895	LPL35	2	0,866	0,884
LP31	1	0,715	0,825	LPL36	2	0,632	1,019
LP32	1	0,785	0,896	LPL37	2	0,602	0,887
LP33	1	0,717	0,881	LPL38	2	0,664	0,884
LP34	1	0,750	0,885	LPL39	2	0,876	0,821
LP35	1	0,714	0,868	LPL40	2	0,842	0,983
LP36	1	0,746	0,866	LPV1	2	0,446	0,773
LP37	1	0,752	0,914	LPV2	2	0,788	0,861
LP38	1	0,791	0,955	LUP	2	0,755	0,985

**Tabelle 10: Mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im *Comet Assay* ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Proben des KORA-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy.**

In der Spalte „Proband“ ist die Nummer der Probe angegeben, die Spalte „Gruppe“ zeigt an, in welcher Auswertungsgruppe die Werte erhoben wurden. Unter „DRC 15 min“ sind die unter Verwendung des TOM errechneten Werte der DNA-Reparaturkapazität nach einer Reparaturdauer von 15 min angegeben, unter „DRC 60 min“ stehen entsprechend die Werte der DRC nach 60 min Reparaturdauer angegeben.

Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
1412132	1	0,463	0,847	1494668	1	0,742	0,872
1412574	2	0,887	0,840	1494685	1	0,495	0,892
1412970	1	0,675	0,782	1494696	1	0,609	0,869
1413915	2	0,668	0,844	1495024	1	0,655	0,896
1414649	2	0,915	1,003	1495134	1	0,741	0,886
1416309	1	0,784	0,890	1495134	1	0,749	0,864
1416785	2	0,798	0,894	1495134	1	0,672	0,853
1417107	2	0,583	0,357	1495254	1	0,755	0,927
1417448	2	0,866	0,902	1495376	1	0,616	0,856
1417577	2	0,799	0,903	1495554	1	0,765	0,899
1417632	2	0,921	0,991	1495582	1	0,734	0,906
1417896	2	0,536	0,928	1495717	1	0,665	0,900
1418306	2	0,786	1,082	1495835	1	0,644	0,886
1418489	2	0,742	1,062	1496031	1	0,713	0,886
1419630	2	0,811	0,946	1496156	1	0,673	0,839
1420304	2	0,089	0,655	1496195	1	0,736	0,900
1420488	2	0,603	0,973	1497114	1	0,650	0,822
1420961	1	0,742	0,844	1497241	1	0,746	0,877
1425018	1	0,636	0,873	1497241	1	0,789	1,000
1432404	1	0,798	0,923	1497241	1	0,725	0,880
1432973	1	0,754	0,872	1810174	3	0,838	0,921
1434457	1	0,557	0,862	1810461	3	0,909	1,033
1438657	1	0,774	0,963	1811019	3	0,786	0,948
1440848	1	0,785	0,930	1811135	3	0,843	0,996
1441079	1	0,689	0,873	1811711	3	0,711	0,884
1442168	1	0,557	0,862	1811769	3	0,746	0,798
1446250	1	0,686	0,846	1813540	3	0,940	0,982
1446272	1	0,759	0,957	1813714	3	0,809	0,895
1451985	1	0,636	0,700	1814181	3	0,895	0,995
1452384	1	0,731	0,864	1814959	3	0,671	0,893
1452843	1	0,712	0,882	1815343	3	0,755	0,838
1453181	1	0,760	0,899	1815455	3	0,898	0,952
1453347	1	0,594	0,849	1816918	3	0,645	0,864
1453500	1	0,722	0,857	1817816	3	0,671	0,926
1453575	1	0,704	0,883	1817827	3	0,763	0,945
1458032	1	0,697	0,865	1818401	3	0,710	0,984
1459242	1	0,752	0,889	1819402	3	0,681	0,757
1467304	2	0,622	0,832	1819645	3	0,874	0,985
1467681	2	0,615	0,841	1820215	3	0,632	0,959
1467846	2	0,372	0,786	1820558	3	0,539	0,884
1468014	2	0,788	0,971	1820976	3	0,761	0,890
1468042	2	0,868	0,983	1822409	3	0,725	1,018
1468369	2	0,704	0,779	1826224	3	0,813	1,014
1468476	2	0,324	0,914	1828516	3	0,894	1,003
1468487	2	0,793	0,856	1828773	3	0,896	0,933
1468594	2	0,491	0,781	1829455	3	0,823	0,966
1468682	2	0,698	0,675	1830005	3	0,792	0,901
1468874	2	0,710	0,966	1833245	3	0,866	1,030
1468891	2	0,615	0,838	1837718	3	0,494	0,919
1468984	2	0,715	0,872	1842418	3	0,609	0,879
1474844	2	0,725	0,970	1843600	3	0,879	0,957
1475497	2	0,710	0,965	1845086	3	0,662	0,929
1479102	1	0,679	0,876	1845517	3	0,845	0,957
1481472	1	0,742	0,916	1845860	3	0,854	0,915



---

Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Proband	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
1487580	1	0,722	0,837	1845893	3	0,822	0,866
1491588	1	0,689	0,852	1845964	3	0,978	0,997
1494153	1	0,667	0,878	1846570	3	0,717	1,019
1494226	1	0,718	0,909	1847664	3	0,798	0,901
1494394	1	0,702	0,871	1848770	3	0,466	0,919
1494435	1	0,746	0,902	1849278	3	0,871	1,014
1494435	1	0,755	0,795	1849793	3	0,683	0,814
1494544	1	0,782	0,903	1852204	3	0,674	0,927
1494569	1	0,779	0,889	1852505	3	0,851	0,932

**Tabelle 11: Mit Hilfe des DNA-Gehalts im Schweif im *Comet Assay* ermittelte DNA-Reparaturkapazität der Proben des LUCY-Kollektivs nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy.**

In der Spalte „Patient“ ist die jeweilige Familienkennung des Patienten angegeben, die Spalte „Gruppe“ zeigt an, in welcher Auswertungsgruppe die Werte erhoben wurden. Unter „DRC 15 min“ sind die unter Verwendung des TOM errechneten Werte der DNA-Reparaturkapazität nach einer Reparaturdauer von 15 min angegeben, unter „DRC 60 min“ stehen entsprechend die Werte der DRC nach 60 min Reparaturdauer angegeben.

Patient	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min	Patient	Gruppe	DRC 15 min	DRC 60 min
3011-200	2	0,822	0,520	13055-200	1	0,781	1,005
3012-200	2	0,840	0,861	13058-200	2	0,863	0,292
4015-200	2	0,430	0,565	13058-200	2	0,849	0,971
4023-200	2	0,346	0,986	14032-200	1	0,780	0,899
4033-200	2	0,237	0,340	16006-200	2	0,821	0,943
4034-200	2	0,880	1,211	16026-200	2	0,954	0,858
4037-200	2	0,770	0,965	16027-200	2	0,771	0,901
4043-200	2	0,686	0,922	16028-200	2	0,186	1,647
4047-200	2	0,857	0,978	16034-200	2	0,796	0,762
4049-200	2	0,784	0,945	16037-200	2	0,846	1,011
4051-200	2	0,733	0,976	17007-200	2	0,746	0,858
4068-200	2	0,770	0,998	17011-200	2	0,757	0,872
5009-200	2	0,700	0,892	17011-200	2	0,618	0,623
6009-200	2	0,225	-0,046	17013-200	1	0,791	0,865
6025-200	2	0,659	0,918	19012-200	1	0,704	0,899
6025-200	2	0,751	0,945	19016-200	2	0,835	1,006
8005-200	2	0,926	0,914	19019-200	2	0,709	0,680
8023-200	1	0,555	0,841	19021-200	2	0,118	-0,485
8026-200	2	0,909	0,952	19021-200	2	0,689	0,978
8027-200	2	0,755	0,884	19023-200	2	0,758	0,615
8028-200	2	0,693	0,921	19024-200	2	0,802	0,866
8033-200	1	0,761	0,896	19025-200	2	1,063	0,939
8035-200	2	0,860	0,993	20005-200	1	0,728	0,895
8040-200	2	0,704	0,914	20017-200	2	0,735	0,955
8041-200	2	0,851	0,979	20025-200	2	0,729	0,949
8042-200	2	0,869	1,038	20028-200	2	0,752	1,075
8043-200	1	0,400	0,871	20030-200	2	0,607	0,727
8047-200	2	0,495	1,111	20031-200	1	0,720	0,916
8053-200	2	0,475	0,908	20032-200	1	0,872	0,753
12003-200	2	0,778	0,940	20035-200	2	0,680	0,864
12006-200	2	0,698	0,845	20037-200	1	0,566	0,787
12006-200	2	0,840	0,975	20041-200	2	0,852	1,031
12006-200	2	0,650	1,033	29008-200	2	0,845	0,934
12013-200	1	0,647	0,917	29008-200	2	0,684	0,753
12016-200	2	0,790	0,879	29009-200	2	0,608	0,893
12016-200	2	0,753	1,099	29009-200	2	0,676	0,947
12018-200	2	0,366	0,570	29011-200	2	0,816	0,702
13009-200	2	0,724	0,164	29012-200	2	0,761	0,974
13014-200	2	0,134	0,605	29012-200	2	0,952	1,010
13014-200	2	0,812	0,962	29015-200	2	0,702	0,761
13020-200	1	0,450	0,748	29016-200	2	0,927	0,976
13023-200	2	0,553	1,011	29019-200	2	0,615	0,828
13023-200	1	0,783	0,874	29022-200	2	0,722	0,542
13024-200	2	0,709	0,867	29023-200	2	0,545	-0,028
13026-200	2	0,775	0,910	29024-200	2	0,447	1,063
13026-200	2	0,982	0,986	29029-200	2	0,866	0,897
13042-200	2	0,591	0,862	29031-200	2	0,496	0,576
13042-200	2	0,588	0,899	32004-200	1	0,620	0,954
13043-200	2	0,784	0,779	32005-200	1	0,757	0,819
13044-200	2	0,884	1,000	32006-200	2	0,879	0,812
13050-200	2	0,615	0,727	32007-200	2	0,851	0,953

**Tabelle 12: DRC<sub>TOM</sub> und DRC<sub>Tail DNA</sub>-Werte von Proben, die als „Ausreißer“ klassifiziert wurden.**

Unter „Kollektiv“ ist aufgeführt, ob die Proben dem LUCY- oder dem KORA-Kollektiv zugehörig sind. Die Nummer unter „Probe“ ist die Kennzeichnung des jeweiligen Patienten oder Probanden, unter DRC<sub>TOM</sub> und DRC<sub>Tail DNA</sub> sind die jeweils ermittelten Werte der DRC nach 15 min und 60 min aufgeführt. In normaler Schrift sind Proben dargestellt, für die genau eine Analyse im *Comet Assay* durchgeführt wurde und die für genau eine Kombination von Parametern auffällige Werte der DRC zeigen. Durch fett gedruckte Schrift sind diejenigen Proben gekennzeichnet, die unter Betrachtung von mehr als einem Parameter geringere Werte der DRC zeigen. Für die kursiv geschriebenen Proben wurde jeweils ein zweiter Versuch durchgeführt, in dem die Proben allerdings DRC-Werte zeigten, die innerhalb des Schwankungsbereichs der Standardkontrolle lagen.

Kollektiv	Probe	DRC <sub>TOM</sub>		DRC <sub>Tail DNA</sub>	
		15 min	60 min	15 min	60 min
LUCY	<b>13014-200</b>	<b>0,117</b>	<b>0,63</b>	<b>0,134</b>	<b>0,605</b>
	<b>4033-200</b>	<b>0,141</b>	<b>0,432</b>	<b>0,237</b>	<b>0,34</b>
	<b>12018-200</b>	<b>0,351</b>		<b>0,366</b>	<b>0,57</b>
	13020-200	0,369			
	<b>13058-200</b>		<b>0,395</b>		<b>0,292</b>
	<b>19021-200</b>		<b>-0,315</b>	<b>0,188</b>	<b>-0,485</b>
	<b>13009-200</b>		<b>0,219</b>		<b>0,164</b>
	<b>6009-200</b>		<b>0,069</b>	<b>0,225</b>	<b>-0,046</b>
	<b>29023-200</b>		<b>0,215</b>		<b>-0,028</b>
	<b>29022-200</b>		<b>0,678</b>		<b>0,542</b>
	16028-200			0,186	
	4023-200			0,346	
	4015-200				0,565
	29031-200				0,576
	19023-200				0,615
	<i>17011-200</i>				<i>0,623</i>
	19019-200				0,68
	3012-200				0,52
KORA	<b>1420304</b>	<b>0,064</b>		<b>0,089</b>	<b>0,655</b>
	1837718	0,293			
	<b>1417107</b>		<b>0,639</b>		<b>0,357</b>
	1468476			0,324	
	1467846			0,372	
	1468682				0,675

**Tabelle 13: Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{apo, ind.}$  der Kontrollzellen SM nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy in allen Versuchen.**

In der Spalte „Versuch“ ist die Kennung des Experiments angegeben, die Werte in den Spalten „0,4 Gy“ und „0,8 Gy“ geben die jeweiligen Werte für  $P_{apo, ind.}$  der induzierten Apoptose nach Bestrahlung in Prozent an. Mit Hilfe der ermittelten Werte für  $P_{apo, ind.}$  für die Kontrolle konnten interexperimentellen Schwankungen für die Proben durch einen Spearman'schen Rangkorrelationstest festgestellt werden.

Versuch	0,4 Gy	0,8 Gy	Versuch	0,4 Gy	0,8 Gy	Versuch	0,4 Gy	0,8 Gy
BfS	23,3	27,5	FP22	17,0	33,0	FP43	33,3	34,4
FP1	34,6	46,9	FP23	35,6	48,9	FP44	28,8	21,0
FP2	14,3	25,4	FP24	22,2	33,1	FP45	34,6	43,3
FP3	21,2	33,6	FP25	3,1	23,1	FP46	33,8	37,2
FP4	25,6	42,2	FP27	27,8	32,5	FP47	50,5	52,4
FP5	18,3	46,4	FP28	12,0	31,4	FP48	19,4	24,4
FP6	26,1	40,2	FP29	13,8	21,1	FP49	28,7	34,8
FP7	35,3	41,6	FP30	30,4	28,0	FP50	26,8	30,8
FP8	25,9	43,1	FP31	34,3	41,8	Jena1	20,0	30,1
FP9	24,2	38,6	FP32	30,5	40,8	Jena2	21,3	30,3
FP10	30,6	41,8	FP33	23,2	34,2	Jena3	16,9	26,2
FP11	22,1	34,2	FP34	31,2	35,1	Jena4	19,2	27,5
FP12	16,1	26,8	FP35	35,5	43,3	Jena5	13,6	19,4
FP13	24,1	35,9	FP36	32,8	42,3	Jena6	10,1	14,1
FP14	23,7	30,7	FP37	31,0	42,4	Jena7	9,2	12,5
FP15	6,9	21,4	FP38	28,0	36,3	Jena8	17,0	23,5
FP17	18,1	27,6	FP39	39,3	48,9	Jena9	11,5	19,4
FP18	20,1	32,7	FP40	17,5	21,9	Jena10	10,9	18,6
FP19	30,3	41,2	FP41	28,1	30,6	Jena11	7,4	14,7
FP21	19,4	24,8	FP42	24,7	28,8	Jena12	12,5	17,5

**Tabelle 14: Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{\text{apo, ind.}}$  der KORA-Proben nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy.**

In der Spalte „Proband“ ist die Kennnummer des Probanden angegeben, die Werte in den Spalten „0,4 Gy“ und „0,8 Gy“ geben die jeweiligen Werte für die  $P_{\text{apo, ind.}}$  nach Bestrahlung in Prozent an.

Proband	0,4 Gy	0,8 Gy	Proband	0,4 Gy	0,8 Gy	Proband	0,4 Gy	0,8 Gy
1412132	14,4	21,8	1467304	25,3	40,4	1495717	14,3	20,1
1412574	16,9	28,2	1467681	17,7	33,5	1495835	9,3	12,5
1412970	21,3	39,4	1467846	24,3	43,8	1496156	20,9	28,4
1413915	20,6	29,4	1468014	11,2	14,2	1497114	15,8	19,1
1414694	25,0	32,3	1468042	24,0	32,5	1497241	16,0	28,5
1416309	5,9	34,6	1468223	13,8	24,9	1810174	15,4	24,7
1416785	14,8	21,3	1468369	61,3	51,7	1810461	7,1	9,3
1417036	16,3	21,2	1468476	19,5	31,3	1811769	10,9	14,5
1417107	19,2	27,1	1468487	10,0	35,2	1813540	12,4	14,4
1417448	18,6	28,2	1468594	23,4	48,7	1813714	2,4	7,6
1417577	15,9	21,2	1468682	19,6	23,8	1815140	7,6	13,4
1417632	25,7	27,3	1468874	23,4	31,9	1815343	7,9	10,9
1417896	16,2	15,6	1468891	16,3	22,3	1816918	16,1	22,7
1418306	29,7	38,1	1468984	17,4	31,4	1817816	6,8	7,9
1418489	19,6	20,0	1474844	22,4	33,0	1818401	7,3	12,0
1419630	18,8	27,6	1475497	27,0	29,0	1819402	7,8	9,5
1420304	33,2	47,3	1479102	13,4	23,6	1819645	6,9	10,5
1420488	17,1	22,5	1481472	8,8	16,7	1820215	10,6	18,8
1420961	40,6	49,8	1484512	11,4	17,5	1820976	8,5	10,1
1425018	14,0	22,2	1487580	7,5	23,1	1828516	11,0	13,1
1432404	12,2	22,9	1491632	5,5	11,8	1828773	19,4	39,1
1432973	33,2	37,7	1494127	7,4	29,5	1829455	14,6	25,0
1434457	41,5	44,3	1494153	10,0	12,7	1830005	5,7	10,2
1438657	12,7	27,6	1494226	24,0	35,1	1830568	24,0	29,7
1439436	20,1	27,7	1494325	10,2	21,1	1833245	7,4	13,3
1440848	11,8	23,0	1494394	19,6	36,7	1833758	12,5	18,4
1441079	11,3	28,7	1494435	14,6	40,2	1837718	5,3	9,4
1442168	47,9	44,9	1494544	13,3	12,0	1842418	2,7	6,9
1446250	9,6	8,2	1494685	14,5	34,6	1843600	11,1	16,4
1448073	5,0	14,7	1494696	18,8	40,4	1845517	15,8	23,2
1451985	23,3	42,0	1495002	7,1	49,9	1845860	7,4	8,6
1452384	26,1	19,7	1495024	19,9	35,4	1845893	12,9	18,2
1452843	36,0	42,0	1495134	12,5	13,5	1847664	13,8	23,6
1453347	15,3	13,2	1495254	11,1	20,1	1848014	15,0	21,1
1453500	16,7	33,2	1495376	18,6	30,9	1848770	15,1	23,2
1457421	7,8	38,8	1495554	28,0	29,8	1848929	23,0	33,4
1457852	14,8	22,1	1495582	-10,3	36,9	1852505	5,7	9,0
1459242	20,8	31,9	1495664	-3,8	0,4			

**Tabelle 15: Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{apo, ind.}$  der LUCY-Patientenproben nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy.**

In der Spalte „Patient“ ist die jeweilige Kennnummer des LUCY-Patienten angegeben, die Werte in den Spalten „0,4 Gy“ und „0,8 Gy“ geben die Werte für die Übergangswahrscheinlichkeiten  $P_{apo, ind.}$  nach Bestrahlung in Prozent an.

Patient	0,4 Gy	0,8 Gy	Patient	0,4 Gy	0,8 Gy	Patient	0,4 Gy	0,8 Gy
12003-200	24,3	31,6	19019-200	25,8	30,6	32005-200	15,5	29,1
12006-200	21,1	29,1	19021-200	24,0	17,9	32006-200	28,2	28,1
12006-200	3,1	13,6	19023-200	20,2	29,8	32007-200	38,1	47,1
12006-200	9,3	11,5	19024-200	17,2	34,9	4015-200	15,3	15,0
12013-200	8,0	18,2	19025-200	26,3	27,0	4023-200	17,0	17,3
12016-200	16,5	22,9	20005-200	13,4	31,9	4025-200	20,6	20,4
12018-200	2,1	8,4	20017-200	18,1	16,2	4032-200	9,0	20,7
13009-200	15,7	13,5	20025-200	24,1	23,6	4034-200	27,5	31,1
13014-200	16,2	14,7	20028-200	17,6	31,6	4037-200	26,6	34,1
13020-200	18,2	19,1	20030-200	9,1	12,0	4043-200	20,9	20,8
13023-200	30,3	37,4	20030-200	15,5	28,7	4047-200	35,8	51,2
13024-200	17,1	26,6	20031-200	24,4	26,1	4049-200	6,1	11,0
13026-200	11,3	11,7	20032-200	12,5	15,5	4051-200	5,0	29,9
13042-200	14,4	26,0	20037-200	-0,6	8,8	4068-200	23,3	31,4
13043-200	5,5	16,7	20041-200	6,8	6,2	5009-200	43,7	35,6
13044-200	23,4	28,8	20049-200	10,2	19,3	6009-200	28,7	32,6
13055-200	14,9	-5,4	29008-200	21,9	36,8	6025-200	17,7	28,5
13058-200	32,2	45,3	29009-200	16,7	18,0	8005-200	22,6	32,8
14032-200	7,2	26,0	29011-200	10,1	13,2	8006-200	14,6	10,0
16006-200	17,8	20,5	29012-200	17,9	25,3	8023-200	39,8	25,0
16026-200	16,4	42,8	29015-200	16,9	13,8	8026-200	28,8	31,7
16027-200	21,0	28,4	29016-200	12,8	12,4	8027-200	27,4	39,9
16028-200	12,3	24,3	29018-200	28,5	35,7	8028-200	23,9	26,4
16034-200	15,0	24,3	29019-200	7,1	11,9	8033-200	4,7	29,2
16037-200	20,1	29,6	29022-200	21,2	31,8	8035-200	16,6	22,2
16042-200	-1,8	1,6	29023-200	30,5	43,8	8039-200	23,0	29,1
17001-200	13,5	17,1	29024-200	22,8	32,9	8040-200	18,5	14,7
17007-200	19,5	37,1	29029-200	10,7	24,2	8041-200	13,8	13,6
17011-200	13,0	21,8	29031-200	32,3	44,9	8042-200	31,4	35,6
17013-200	10,3	28,3	3011-200	45,4	50,0	8043-200	16,3	23,6
19012-200	2,7	16,7	3012-200	27,7	43,9	8047-200	13,0	22,3
19016-200	19,3	24,0	32004-200	-7,6	15,0	8053-200	18,1	19,8

**Tabelle 16: Liste der erzeugten Zelllinien des KORA- und LUCY-Kollektivs.**

Ausgewählt wurden Proben, deren korrespondierenden primären Lymphozyten im Annexin V-Assay auffällig hohe bzw. geringe Apoptoseraten oder mittlere Apoptoseraten zeigten.

Kollektiv	Zelllinie	Apoptoserate im Annexin V-Assay	Kollektiv	Zelllinie	Apoptoserate im Annexin V-Assay
KORA	1467304	hoch	LUCY	4047-200	hoch
KORA	1420961	hoch	LUCY	29031-200	hoch
KORA	1442168	hoch	LUCY	8042-200	hoch
KORA	1434457	hoch	LUCY	8027-200	hoch
KORA	1467846	hoch	LUCY	29023-200	hoch
KORA	1452843	hoch			
KORA	1829455	mittel	LUCY	29012-200	mittel
KORA	1848770	mittel			
KORA	1416785	mittel			
KORA	1819645	gering	LUCY	12018-200	gering
KORA	1830005	gering	LUCY	29019-200	gering
KORA	1852505	gering	LUCY	29011-200	gering
KORA	1813714	gering			
KORA	1842418	gering			
KORA	1810461	gering			

**Tabelle 17: Vergleich der strahleninduzierten Apoptoseraten in primären Lymphozyten mit ihren korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien in Proben des KORA-Kollektivs.**

In der Spalte „Versuch“ ist der Versuch bezeichnet, der an den LCL durchgeführt wurde, „Dosis 1“ ist die in diesem Versuch eingesetzte Dosis für die Bestrahlung. Verglichen wurden jeweils die in der Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1) bzw. der Detektion von Caspasen durch Nachweis eines Caspaseninhibitors nach Bestrahlung in den LCL ermittelten Werte mit dem Anteil strahleninduzierter Apoptose im Annexin V-Assay an primären Lymphozyten. Die im Annexin V-Assay eingesetzte Strahlendosis ist unter „Dosis 2“ angeführt, „Zeitpunkt“ bezeichnet den Zeitpunkt der Ernte für die jeweiligen Versuche an den LCL. Die Ernte erfolgte im Annexin V-Assay immer 48 h nach Bestrahlung. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beschreibt, ob eine lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen in den LCL und den primären Zellen besteht. Die Art der Korrelation sagt aus, ob die mögliche Korrelation zwischen den Versuchen positiv oder negativ ist. Eine positive Korrelation bedeutet, dass die Versuche in den LCL die Ergebnisse, die für die primären Lymphozyten gewonnen wurden, wieder spiegeln, eine negative Korrelation bedeutet, dass die LCL umgekehrtes Verhalten zeigen.

Versuch	Dosis 1	Dosis 2	Zeitpunkt	Bestimmtheitsmaß $R^2$	Art der Korrelation
Sub G1	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,39	-
			48 h	0,32	-
			72 h	0,12	-
		0,8 Gy	24 h	0,38	-
			48 h	0,19	-
			72 h	0,14	-
	12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,14	-
			48 h	0,27	-
			72 h	0,22	-
		0,8 Gy	24 h	0,25	-
			48 h	0,16	-
			72 h	0,21	-
Caspase-inhibitor	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,03	+
			48 h	0,10	-
			72 h	0,32	+
		0,8 Gy	24 h	0,00	-
			48 h	0,15	-
			72 h	0,16	+
	12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,04	+
			48 h	0,07	-
			72 h	<b>0,54</b>	+
		0,8 Gy	24 h	0,01	+
			48 h	0,16	-
			72 h	0,36	+



**Tabelle 18: Vergleich der strahleninduzierten Apoptoseraten in primären Lymphozyten mit ihren korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien in Proben des LUCY-Kollektivs.**

Die Definition der eingetragenen Parameter entspricht Tabelle 17.

Versuch	Dosis 1	Dosis 2	Zeitpunkt	Bestimmtheitsmaß $R^2$	Art der Korrelation
Sub G1	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,13	+
			48 h	0,03	+
			72 h	0,00	+
		0,8 Gy	24 h	0,22	+
			48 h	0,09	+
			72 h	0,04	+
	8 Gy	0,4 Gy	24 h	0,16	+
			48 h	0,00	-
			72 h	0,01	+
		0,8 Gy	24 h	0,24	+
			48 h	0,01	+
			72 h	0,09	+
Caspaseinhibitor	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,01	+
			48 h	0,01	+
			72 h	0,00	-
		0,8 Gy	24 h	0,05	+
			48 h	0,03	+
			72 h	0,01	+
	8 Gy	0,4 Gy	24 h	0,24	+
			48 h	0,06	+
			72 h	0,11	+
		0,8 Gy	24 h	0,27	+
			48 h	0,05	+
			72 h	0,03	+
Caspaseinhibitor	8 Gy	0,4 Gy	24 h	0,33	+
			48 h	0,11	+
			72 h	0,06	+
		0,8 Gy	24 h	0,07	+
			48 h	0,06	+
			72 h	0,24	+
	12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,07	-
			48 h	0,01	+
			72 h	0,01	+
		0,8 Gy	24 h	0,04	-
			48 h	0,00	+
			72 h	0,00	-

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit und die interessante Themenstellung bedanken. Stets hatte sie ein offenes Ohr und war zu anregenden Diskussionen bereit.

Für viele konstruktive Vorschläge zur Durchführung meiner Arbeit sowie die kritische Durchsicht meines Manuskripts und möchte ich mich bei Herrn Dr. Daniel Sagan bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe DNA-Reparatur für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft sowie das entgegengebrachte Interesse bedanken. Mein Dank gilt insbesondere meinen Mit-Doktorandinnen Marita Angermeier, die mit mir das Büro teilte, Astrid Rickinger, die das „Schwesterprojekt“ bearbeitete, Sylvia Steininger und Arunee Hematulin sowie Frau Dr. Hedda Eichholtz-Wirth und Frau Dr. Simone Mörtl für die moralische Unterstützung. Hervorheben möchte ich besonders Nancy Kunz, die mich bei unendlich vielen *Comet Assays* unterstützt hat, und Klaudia Winkler wegen unzähliger kleiner Tipps, Tricks und Gefälligkeiten, die mir das Leben erleichtert haben.

Für die großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung gilt mein Dank Herbert Braselmann, Institut für molekulare Strahlenbiologie am Helmholtz Zentrum München.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Eberhard Fritz, Fritz Lipmann Institut, Jena, für die Projektleitung und die Erstellung der vielen Berichte an das Bundesamt für Strahlenschutz sowie Frau Dr. Sabine Hornhardt, Bundesamt für Strahlenschutz, für die Betreuung des Projekts im Bundesamt für Strahlenschutz bedanken. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Maria Gomolka und Frau Dr. Ute Rößler, Bundesamt für Strahlenschutz, für die Betreuung bei der Auswertung des *Comet Assays*.

Für die Bereitstellung der verschiedenen Zellen der KORA- und LUCY-Kollektive möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Erich Wichmann, Herrn Dr. Thomas Illig und Frau Dr. Wiebke Sauter, Institut für Epidemiologie am Helmholtz Zentrum München, bedanken.

Schließlich möchte ich mich noch bei Frau Prof. Dr. Weiß bedanken, die sich sofort für das Übernehmen des Zweitgutachtens bereit erklärt hat.

Von ganzem Herzen möchte ich mich zu guter Letzt bei meiner Familie und insbesondere bei meinem Mann bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn ich Unterstützung brauchte.

# Lebenslauf

Name	Irene Jaehnert
Geburtsdatum	9. 5. 1977
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet, geborene Müller

## Beruflicher Werdegang

01 / 03 – 12 / 04	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für molekulare Strahlenbiologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg
-------------------	--

## Schulische und Hochschulausbildung

04 / 05 – 07 / 08	Promotion bei Frau Prof. Dr. Eckardt-Schupp am Institut für Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München
11 / 01 – 09 / 02	Diplomarbeit bei Herrn PD Dr. Horst Zitzelsberger am Institut für molekulare Strahlenbiologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg
11 / 96 – 09 / 02	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1987 – 1996	Carl-Orff-Gymnasium Unterschleißheim Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 29.07.2008

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, den 29.07.2008